NGÔ ĐĂNG NGHĨA
TRANG SĨ TRUNG

POLYMER SINH HỌC BIỂN

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC VIỆT NAM

24777

NGÔ ĐĂNG NGHĨA
TRANG SĨ TRUNG

POLYMER SINH HỌC BIỂN

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC VIỆT NAM

Lời nói đầu

Giống như tên sách, polymer sinh học biển là một dạng hợp chất cao phân tử có nguồn gốc từ sinh vật biển, trải rộng từ các vi sinh vật cho đến thực vật và động vật biển. Các polymer này có bản chất hoá học rất đa dạng và phong phú. Trong cùng một chất, tính đa dạng của chúng cũng rất lớn. Chính điều đó làm cho các polymer sinh học có thể đảm nhận nhiều tính chất chức năng bao trùm trên một phạm vi rộng lớn bên trong cơ thể sinh vật và các ứng dụng đa dạng khi được tách chiết ra.

Trong khuôn khổ rất hạn chế của cuốn sách, chúng tôi chỉ giới thiệu một số polymer sinh học biển thường gặp, đã được nghiên cứu và phát triển ứng dụng phổ biến nhất. Đó là các polysaccharide từ rong biển bao gồm agar, alginate và carrageenan. Đối với các polymer sinh học từ động vật, chúng tôi chọn hai chất có ứng dụng quan trọng nhất là chitin và collagen.

Một đặc điểm quan trọng của các polymer sinh học là tính đa dạng trong cấu trúc. các polysaccharide đều có cấu trúc thay đổi theo loài, điều kiện sinh sống ; trên cùng một cá thể, cấu trúc của một polysaccharide cũng có thể thay đổi. Chính điều này làm cho việc nghiên cứu cấu trúc trở nên rất khó khăn và các đại lượng đặc trưng cho cấu trúc đều có tính chất thống kê. Về mặt sản xuất, tính chất này làm cho các nhà công nghiệp gặp nhiều trở ngại khi muốn ổn định chất lượng và tính chất của sản phẩm. Trong phần 1, hai chương đầu của cuốn sách được dành cho việc trình bày cấu trúc và quan hệ cấu trúc – tính chất của các polymer sinh học biển. Do bản chất phức tạp của cấu trúc phân tử, của cấu hình trong dung dịch và tương tác giữa chúng, các mô hình toán mô tả đôi khi trở nên phức tạp và khó hình dung, chẳng hạn như các khai triển virial của các phương trình mô tả dung dịch loãng. Vì vậy, chúng tôi cố gắng hạn chế các công thức toán học và thay vào đó bằng các mô tả vật lí để bạn đọc dễ hình dung. Chương 3 trình bày vắn tắt các phương pháp quan trọng nhất trong nghiên cứu các polymer sinh học là phương pháp đo độ nhớt, các phổ như cộng hưởng từ, phổ hồng ngoại, sắc kí lọc gel và phương pháp điện di.

Phần 2 và phần 3 của cuốn sách dành cho việc giới thiệu các polymer sinh học biển cụ thể. Mỗi phần đều được trình bày theo trình tự chung là nguồn gốc sinh vật dùng tách chiết polymer, cấu trúc hoá học và tính chất, quy trình tách chiết và cuối cùng là ứng dụng. Trong phần nguồn gốc, chúng tôi không có tham vọng nêu tất cả các loài mà chỉ nêu một số loài thường dùng trong sản xuất. Ở phần cấu trúc tính chất, các phương pháp nghiên cứu quan trọng đã trình bày đều được áp dụng trong việc mô tả cấu trúc và giải thích các trạng thái cũng như biến đổi động thái của các polymer. Công nghệ tách

chiết được nhấn mạnh ở các nguyên lí và các công đoạn quan trọng nhất, sao cho giữ được cấu trúc và tính chất càng ít bị hư hại trong quá trình tách chiết càng tốt hơn là mô tả tỉ mỉ công nghệ. Các thông số công nghệ cụ thể ít có ý nghĩa khi đi từ loài này đến loài khác trong việc tách chiết. Do đó chúng tôi khuyên độc giả nên tự kiểm tra để tìm ra các thông số cụ thể hơn là áp dụng một cách máy móc các con số. Tính nhạy cảm và dễ bị ảnh hưởng của các polymer sinh học khi tách chiết đòi hỏi sự tinh tế của người nghiên cứu và luôn thay đổi tuỳ theo nguyên liệu.

Phần ứng dụng của các polymer được tập trung vào các tính chất mới và liên quan nhiều đến các khám phá tinh tế trong cấu trúc. Các ứng dụng hiện đại của các polymer sinh học biển có xu hướng tập trung vào y sinh học và công nghệ sinh học hiện đại. Từ các ứng dụng đơn giản trong thực phẩm hay kĩ thuật, các polymer sinh học ngày càng được ứng dụng sâu xa hơn trong công nghệ sinh học và y dược như cố định tế bào, kĩ thuật mô, kĩ thuật nhả chậm thuốc và điều chế thuốc. Các phân tử polymer sinh học khi được biến đổi cấu trúc một cách chủ động (tailoring) đã mang lại các ứng dụng rất chuyên biệt. Vai trò của nó trong việc điều hoà một số chức năng trong cơ thể đã mang lại nhiều chú ý hơn là quan niệm chỉ dùng làm chất độn trong thực phẩm. Khi bị thuỷ phân đến các oligomer có phân tử lượng thích hợp, các polymer sinh học biển còn bộc lộ nhiều tính chất quý giá như kích thích sinh trưởng, tăng cường hệ miễn dịch và giảm nguy cơ mắc một số bệnh.

Trong quá trình biên soạn sách, khó tránh khỏi những sai sót ngoài ý muốn, rất mong quý bạn đọc góp ý để những lần xuất bản sau được hoàn chỉnh hơn. Cuối cùng, chúng tôi xin chân thành cám ơn Đại sứ quán Na Uy tại Việt Nam, lãnh đạo Trường Đại học Nha Trang, Ban quản lí Dự án SRV17025 đã tạo điều kiện và tài trợ kinh phí cho việc thực hiện cuốn sách này. Để hoàn thiện cuốn sách, không thể thiếu sự góp ý của các đồng nghiệp và vai trò của người biên tập, chúng tôi cũng xin chân thành cảm ơn các bạn đồng nghiệp và Ban biên tập Khoa học tự nhiên, Công ty CP Dịch vụ xuất bản giáo dục Gia Định (Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam) đã sửa chữa và đóng góp nhiều ý kiến quý báu.

CÁC TÁC GIẢ

PHẦN 1: CÁC KIẾN THỨC CĂN BẢN VỀ POLYMER SINH HỌC

CHƯƠNG 1

CẤU TRÚC HOÁ HỌC CỦA CÁC POLYMER SINH HỌC

1. Các đại phân tử polymer và polymer sinh học

Polymer hay đại phân tử là các phân tử được tạo thành từ các đơn vị nhỏ hơn là các monomer. Polymer thường có dạng mạch thẳng với nhiều hình dạng khác nhau. Oligomer có số lượng các monomer ít hơn từ 2 đến 20. Một phân tử được xem như đại phân tử khi khối lượng phân tử của nó lớn hơn 10.000 g/mol.

Polymer sinh học là các đại phân tử có nguồn gốc từ sinh vật. Khi các sinh vật đó là các động thực vật biển, ta có các polymer sinh học biển.

Các polymer sinh học được chia làm 4 nhóm chính: nucleotid, protein, carbohydrate và lipid. Liên quan đến các sinh vật biển, cuốn sách này trình bày giới hạn ở hai loại polymer sinh học là protein và polysaccharide, là hai nhóm có ứng dụng rất rộng.

Bảng 1.1 Chức năng, nhóm và phân loại polymer sinh học

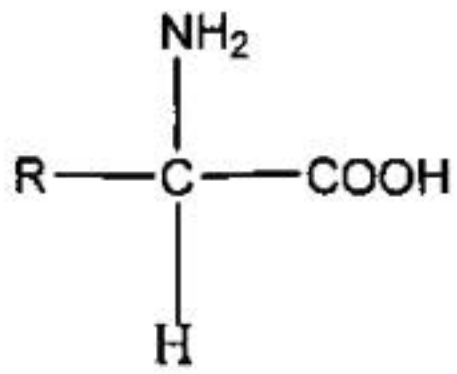
Chức năng	Nhóm	Phân loại
Xúc tác	Enzyme	Protein
Tồn trữ năng lượng	Tinh bột, glycogen	Polysaccharide
Tạo cấu trúc	Collagen, cellulose, chitin	Protein, polysaccharide, glycoprotein
Lưu trữ và truyền thông tin	DNA, RNA	Acid nucleic
Nhận biết phân tử và tế bào	Thụ thể	Glycoprotein
	Myosin	Protein
Chuyển hoá năng lượng hoá học thành năng lượng cơ học		
Phát tín hiệu	Hormone	Protein, oligopeptide, steroid
Bơm ion	Cấu trúc màng	Protein
Bôi trơn	Mucin	Glycoprotein, polysaccharide

2. Protein

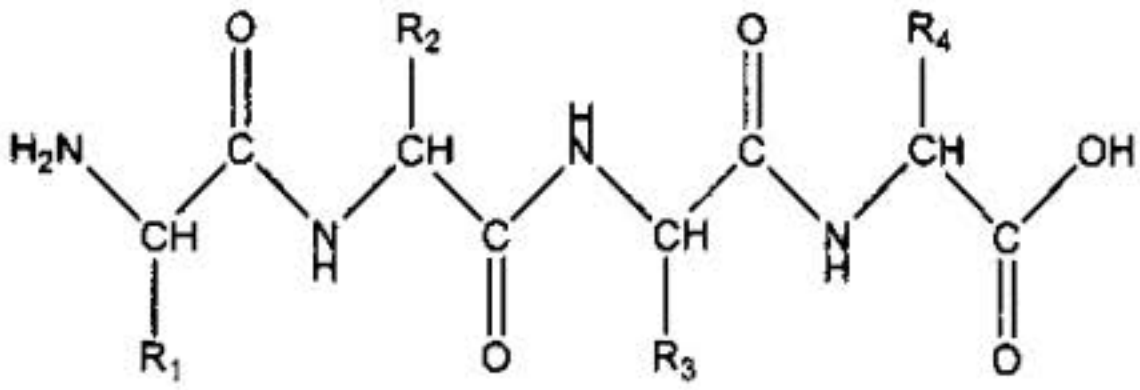
Protein đóng vai trò trung tâm trong sinh hoá. Chúng phân bố rất rộng trong tự nhiên và ảnh hưởng đến tất cả các phản ứng trong cơ thể sống. Một số protein là các enzyme đóng vai trò xúc tác cho các phản ứng sinh hoá theo một cách rất đặc trưng. Một số khác đóng vai trò như các động cơ hoá sinh và chuyển hoá năng lượng hoá học thành chuyển động của các tế bào cơ. Protein còn đóng vai trò cấu tạo cấu trúc cho cơ thể như collagen.

a) Các acid amin

Protein có cấu tạo từ các acid amin. Acid amin đơn giản nhất là glycine, có thể phát sinh từ acid acetic khi thay một nguyên tử hydro bằng nhóm amin. Nếu thay một nguyên tử hydro khác bằng nhóm CH_3 ta có một acid amin khác là alanine. Do đó ta có thể viết công thức tổng quát của acid amin như sau:

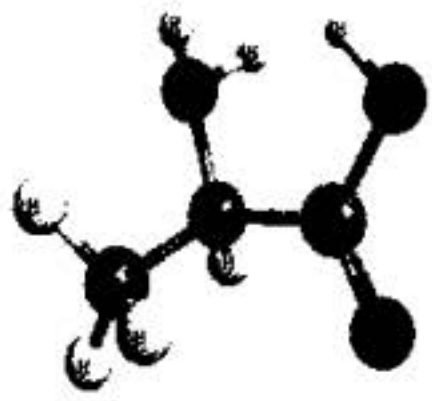


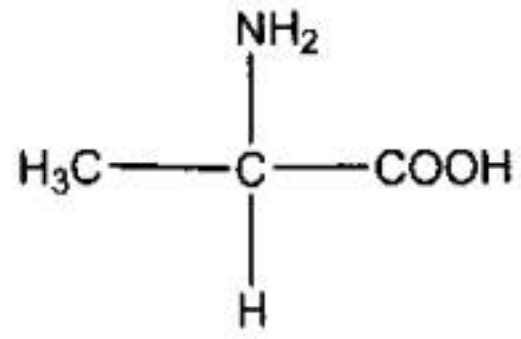
Các acid amin có thể tạo ra các liên kết peptide giữa chúng bằng phản ứng trùng ngưng (condensation reaction). Nhiều acid amin có thể liên kết với nhau thành một mạch dài gọi là polypeptide. Polypeptide có đầu cuối là một amin (N-terminal) hay một carboxyl (COOH terminal). Trong tự nhiên các acid amin phân bố dọc theo mạch polypeptide theo một trình tự nghiêm ngặt. Một protein gồm có một đến bốn chuỗi như thế, chúng nối với nhau bằng các liên kết vật lí và các cầu disulfide giữa các gốc cystein từ các mạch khác nhau.



Trong tất cả các acid amin ngoại trừ glycine, nguyên tử carbon α tạo nên một trung tâm bất đối. Các nhóm thế trên nguyên tử carbon này có thể sắp xếp theo hai cách đối xứng với nhau qua gương. Khi vẽ mạch carbon nằm ngang trên giấy và nguyên tử carbon đánh số cao nhất hướng về phía trên tờ

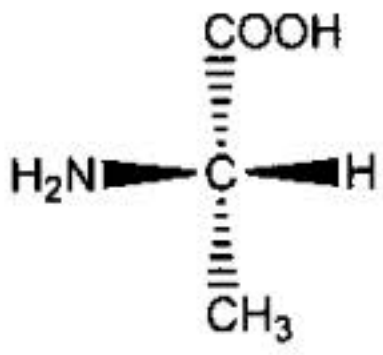
giấy, nếu nhóm chức nằm bên trái, ta có cấu hình dạng L, nếu nhóm chức nằm bên phải, ta có dạng D.



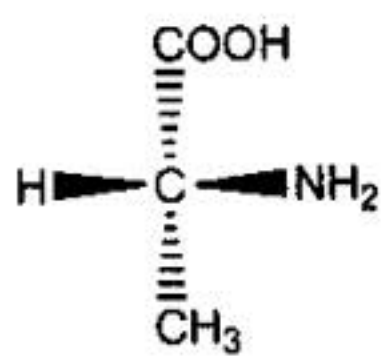


Hình 1.1 Phân tử acid amin alanin

Trong tự nhiên tất cả các protein đều cấu thành từ L acid amin. Dạng D chỉ xuất hiện trong một ít cấu trúc sinh học như vách tế bào của một số vi khuẩn, chất kháng sinh hay nọc rắn ở dạng các oligo-peptide. Các protein thông thường cấu tạo từ 20 acid amin khác nhau. Người ta phân nhóm theo tính chất hoá học của các nhóm bên. Mỗi acid amin được viết tắt bằng 3 chữ cái. Ví dụ acid aspartic viết tắt là Asp, acid glutamic là Glu.



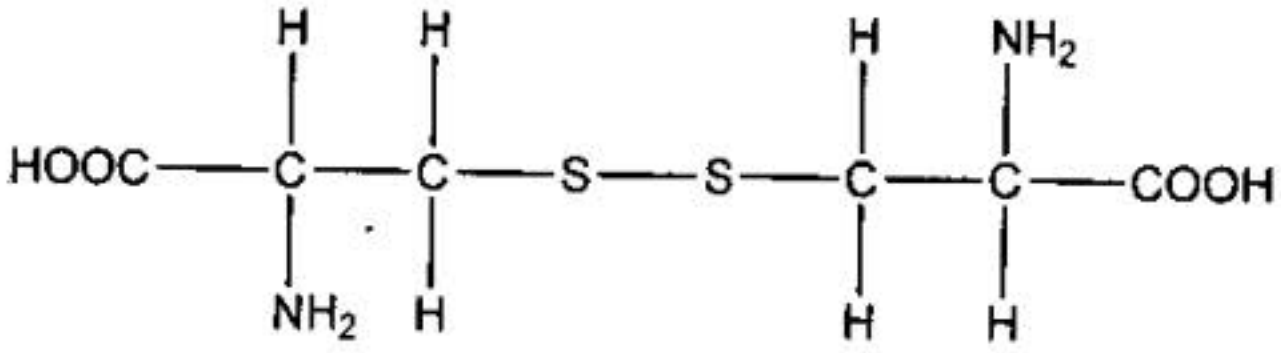
L-Alanine



D-Alanine

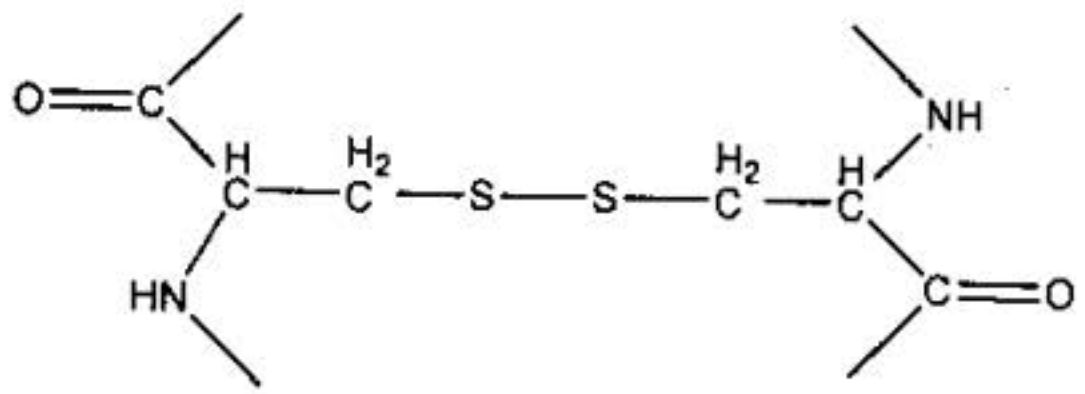
Các nhóm bên chứa các nhóm chức $-NH_2$ ($-NH_3^+$), $-COOH$ ($-COO^-$), $-OH$, $-SH$... có thể tham gia các phản ứng hoá học và tương tác vật lí giữa chúng và các phân tử khác. Trong glycoprotein, mạch đường liên kết hoá học với các nhóm chức của các acid amin, thường gặp nhất là serine và threonine. Liên kết này được tạo thành do sự trùng ngưng giữa OH của một

gốc đường với nhóm hydroxyl của carbon β trên một acid amin. Acid amin cystein có nhóm mercapto (–SH) liên kết với nhóm bên của một cystein khác tạo thành các cầu nối disulfide (S–S).



Phân tử cystine tạo bởi cầu nối disulfide từ hai phân tử cysteine.

Khi acid amin cùng nằm trên một mạch peptide, các liên kết disulfide sẽ tạo vòng kín hoặc uốn cong mạch. Liên kết này cũng có thể nối hai mạch khác nhau.



Liên kết disulfide giữa hai mạch polypeptide khác nhau.

Phần lớn các sinh vật cần có 20 acid amin này để tổng hợp nên các protein. Một số sinh vật như thực vật, có thể tổng hợp tất cả các acid amin từ các chất vô cơ. Một số sinh vật khác (như con người) không có khả năng tổng hợp một số acid amin và do đó phải lấy chúng từ thực phẩm. Người ta gọi chúng là các acid amin thiết yếu. Các acid amin thiết yếu đối với con người là valine, leucine, isoleucine, lysine, threonine, tryptophan, methionine, phenylalanine, histidine và arginine. Hai acid amin cystein và tyrosine là các acid amin thiết yếu có điều kiện. Chúng được tổng hợp tương ứng từ methionine (lấy gốc $–CH_3$) và phenylalanine (thêm –OH). Protein dùng làm thực phẩm phải có đủ các acid amin thiết yếu. Protein từ động vật có thành phần tương tự protein của người. Những người chỉ ăn protein từ thực vật có nguy cơ thiếu các acid amin thiết yếu. Protein từ ngũ cốc thiếu hai acid amin là lysine và tryptophan. Bệnh do thiếu các acid amin trong thực phẩm rất phổ biến ở trẻ em các nước đang phát triển.

Tất cả các acid amin đều có chứa nhóm amin và nhóm carboxyl có thể nhận hay cho đi proton. Một số acid amin có chứa các nhóm bên là nhóm kiềm, nhận proton hay nhóm acid, cho proton. Do đó, các protein là các chất đa điện li, là tính chất rất quan trọng trong sinh học. Cần chú ý là cả acid amin

và protein đều có chứa các nhóm base và nhóm acid trong cùng một phân tử, do đó chúng có điện tích tổng là âm, dương hoặc trung hoà, nghĩa là số điện tích âm bằng số điện tích dương.

Acid amin đơn trị: $HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$

Hằng số phân li K_a được định nghĩa: $K_a = \frac{[H^+].[A^-]}{[HA]}$

Nồng độ tổng cộng của acid thêm vào hệ thống là: $C_0 = [HA] + [A^-]$

Gọi độ phân li là α: $\alpha = \frac{[A^-]}{C_0}$

Thay vào phương trình trên ta có: $K_a = \frac{[H^+].\alpha}{1-\alpha}$

Lấy logarit hai vế ta có: $\log K_a = \log[H^+] + \log\frac{\alpha}{1-\alpha}$

Ta thu được phương trình Henderson-Haselback:

$$pH = pK_a + \log\frac{\alpha}{1-\alpha} \qquad (1.1)$$

Với $pH = -\log[H^+]$ và $pK_a = -\log K_a$

Tương tự với acid amin hoá trị hai (divalent)

$$H_2A^+ \rightleftarrows HA^{\pm} + H^+ \rightleftarrows A^- + 2H^+$$

Điểm đẳng điện hay pH đẳng điện, kí hiệu là pI, là giá trị pH tại đó điện tích tổng của acid amin bằng không và phân tử không di chuyển trong trường tĩnh điện. Tại pH lớn hơn pI, phân tử tích điện âm và đi về phía anod. Ở pH nhỏ hơn pI phân tử tích điện dương và đi về phía catod. Có thể xác định điểm đẳng điện bằng thiết bị điện di hoặc tính toán nếu biết các nhóm chức.

Nhóm carboxyl phân li như sau:

$$^+NH_3–CHR–COOH \rightleftharpoons H^+ + {}^+NH_3–CHR–COO^-$$

$$K_{a,1} = \frac{[HA^{\pm}].[H^+]}{[H_2A^+]}$$

Đối với nhóm amin:

$$^{+}NH_3–CHR–COO^{-} \rightleftharpoons H^{+} + NH_2–CHR–COO^{-}$$

$$K_{a,2} = \frac{[A^{-}].[H^{+}]}{[HA^{\pm}]}$$

Sau khi biến đổi ta có: $\frac{[HA^{\pm}][H^{+}]}{K_{a,1}} = \frac{K_{a,2}[HA^{\pm}]}{[H^{+}]}$

Lấy logarit hai vế ta có: $pH = pI = \frac{1}{2}(pK_{a,1} + pK_{a,2})$ (1.2)

Đối với alanin có: $pK_{a,1} = 2,35$, $pK_{a,2} = 9,7$ ta có pI = 6

Bảng 1.2 Điểm đẳng điện của một số acid amin

Acid amin	$pK_{a,1}$	$pK_{a,2}$	pI
Glutamine	2,2	9,1	5,65
Serine	2,2	9,15	5,7
Leucine	2,35	9,6	6
Alanine	2,35	9,7	6
Glycine	2,4	9,6	6

b) Cấu trúc và tính chất căn bản của protein

Protein bao gồm một hay nhiều chuỗi peptide, trong đó các acid amin liên kết theo một trình tự xác định. Các protein là đơn phân tán vì đối với mỗi protein, số acid amin là xác định và trình tự của chúng là nghiêm ngặt. Số lượng acid amin và trình tự của chúng tạo nên cấu trúc bậc một của protein. Protein có số lượng nhóm chức khác nhau và làm cho chúng phù hợp với các chức năng sinh học và phản ứng chuyên biệt. Các chức năng đó liên quan mật thiết với các cấu trúc phức tạp trong không gian ba chiều.

Cho đến nay, người ta đã biết cấu trúc bậc một của hơn 10 000 protein. Một kết luận rút ra từ các công trình nghiên cứu là protein từ các sinh vật rất khác nhau, với cùng chức năng hoá sinh thường có cấu trúc bậc một rất giống nhau hoặc đồng nhất. Quan sát này có ý nghĩa trong việc giúp cho việc chỉ ra tính chất của một protein mới phát hiện. Khi đã biết cấu trúc bậc

một của protein, người ta có thể tra dữ liệu điện tử có chứa tất cả cấu trúc của các protein đã biết và tìm ra các chức năng chuyên biệt của nó.

Cấu trúc bậc hai của protein

Cấu trúc xoắn α

Trong mạch peptide, liên kết C-N có khoảng cách ngắn hơn là liên kết C-N trong các hợp chất khác. Điều này cho thấy liên kết peptide có một phần đặc tính của liên kết đôi và do đó không thể quay tự do như các liên kết N-C_α và C-C_α trong mạch polypeptide. Mỗi liên kết peptide nằm trong một mặt phẳng và hai mặt phẳng nối với cùng một carbon alpha có thể quay tương đối với nhau. Điều này tạo nên sự xoắn của một mạch polypeptide. Khi mạch polypeptide xoắn phải, ta có cấu trúc bậc hai α xoắn phải, là cấu trúc thường gặp nhất trong tự nhiên với mỗi vòng xoắn gồm ba gốc acid amin. Các liên kết hydro N-H tạo nên sự bền vững của cấu trúc xoắn. Một cấu trúc cấp hai α khác là xoắn trái của mạch polyproline không tìm thấy trong các protein hình cầu nhưng tạo nên cấu trúc cấp hai của collagen.

Cấu trúc nếp gấp β

Theo cấu hình này, mặt phẳng chuỗi polypeptide có dạng tấm gấp nếp (pleated sheets) và chia làm hai loại: loại đối song song trong đó các đoạn polypeptide đi từ đầu -NH_2 đến đầu -COOH theo các chiều ngược nhau; loại song song có các đoạn polypeptide chạy cùng chiều.

Cấu trúc uốn β

Theo cấu trúc này, đoạn polypeptide uốn cong lại chính nó và được duy trì bằng một liên kết hydro. Mỗi vòng uốn β có 4 gốc acid amin.

Trong một phân tử protein có thể chứa một hai cả ba loại cấu trúc cấp hai nói trên với tỉ lệ khác nhau.

Cấu trúc bậc ba của protein

Các tương tác không phải là cộng hoá trị giữa các đoạn polypeptide có cấu trúc bậc hai khác nhau cùng với tương tác giữa các nhóm bên và mạch chính tạo nên cấu trúc cấp ba của một protein. Một điểm chủ yếu trong cấu trúc cấp ba là các nhóm R không phân cực. Chúng tạo thành vùng kị nước từ các nhóm bên R phân bố ở các gốc acid amin khác nhau trong mạch. Động lực tạo nên cấu trúc cấp ba một phần là do các vùng kị nước này. Trong các protein hình cầu, có từ 25-30% các gốc acid amin có các chuỗi bên (side chain) là kị nước và 45-50% có các chuỗi bên là ion hay phân cực. Cấu trúc cấp ba tự nhiên của một protein có tính cân bằng thuận nghịch nhiệt động lực với các cấu hình khác tuỳ thuộc vào độ pH, nhiệt độ, thành phần và môi trường nước. Một động lực khác tạo nên cấu trúc cấp ba là các nhóm R ion

hoá như ở các acid amin aspartic, glutamic, arginine và lysine. Giống như cấu trúc của các hạt micelle, các gốc R ion hoá hướng nhiều nhất về phía môi trường nước.

Cấu trúc bậc bốn của protein

Protein có cấu trúc cấp bốn khi được cấu tạo từ các tiểu phần (subunit). Số lượng các tiểu phần có thể từ hai đến vài chục. Một trong những ví dụ về cấu trúc cấp bốn của protein là phân tử hemoglobin có cấu tạo từ bốn chuỗi polypeptide, phần lớn các chuỗi đó có cấu trúc xoắn α. Mỗi tiểu phần liên kết với một phần không có bản chất protein gọi là nhóm hem có chứa một nguyên tử sắt. Cấu trúc cấp bốn tạo nên tính chất chức năng đặc thù cho protein. Đa số các phân tử protein kích thước lớn được tạo thành từ các tiểu phần. Mặc dù khối lượng phân tử có thể lên tới hàng triệu đơn vị, các protein lớn được tạo thành từ các chuỗi peptide ban đầu nhỏ hơn nhiều.

Hiểu biết về tính chất tĩnh điện của protein rất cần thiết khi cần phân riêng hay tinh chế protein (điện di, sắc kí trao đổi ion), cho các chức năng sinh học và cho các tính chất chức năng trong y dược. Nhìn chung, tính chất của protein như một phân tử mang điện cũng giống như acid amin. Khi pH < pI, protein mang điện dương, khi pH > pI, protein mang điện âm. Khi pH rất thấp, nó sẽ trung hoà tất cả các nhóm carboxyl và khi pH rất cao, nó sẽ trung hoà tất cả các nhóm amin. Giá trị của điểm đẳng điện phụ thuộc vào lượng tương đối của các acid amin mang tính acid và base. Nếu Asp và Glu vượt trội, pI sẽ có giá trị thấp. Trong khi nếu Lys và Arg vượt trội, pI sẽ có giá trị cao.

Protein có thể có dạng hình cầu, hình ellipsoid hay dạng thanh. Các protein hình cầu hay gần hình cầu điển hình là ribonuclease, insulin, chymotrypsinogen và pepsin. Các protein như fibrinogen là protein trong huyết tương hay myosine là protein chính của sợi cơ, có dạng ellipsoid trục dài. Fibrinogen của người có trục ngắn là 38Å và trục dài là 700 Å. Khối lượng phân tử và hình dạng của protein liên quan chặt chẽ đến độ nhớt của protein trong dung dịch. Với cùng khối lượng phân tử, protein hình cầu có độ nhớt thấp hơn protein có dạng không đối xứng.

Mỗi protein có đặc tính tan khác nhau trong dung môi đã cho. Độ hoà tan phụ thuộc mạnh vào độ pH và có giá trị thấp nhất tại điểm đẳng điện pI. Ở pH đẳng điện, lực đẩy tĩnh điện giữa các phân tử protein là thấp nhất và các lực tạo mạng lưới tinh thể rắn là lớn nhất. Khi phân tử protein ở các giá trị pH xa điểm đẳng điện ở cả hai phía, protein sẽ tích điện âm hoặc dương mạnh hơn và do đó tính tan tăng lên.

Các loại muối có thể làm tăng hoặc giảm độ hoà tan của protein. Khi muối làm tăng độ tan, ta có hiệu ứng *salting-in* như trong trường hợp của NaCl

đối với hemoglobin. Ngược lại, khi nồng độ muối tăng dẫn tính giảm tính tan và gây kết tủa protein, ta có hiệu ứng *salting-out*, như muối Na_2SO_4 đối với hemoglobin.

Khi phân tử protein bị thay đổi cấu hình ở các mức độ khác nhau, ta có sự biến tính của protein. Biến tính là một quá trình phức tạp do tương tác giữa tác nhân gây biến tính và phân tử protein dẫn đến sự thay đổi cấu hình mà trong nhiều trường hợp không dễ mô tả sự thay đổi đó. Tất cả các tác nhân gây biến tính đều phá vỡ cấu trúc do các liên kết không cộng hoá trị ở một mức độ nào đó. Có những biến tính trung bình không thay đổi hoạt tính của protein nhưng cũng có trường hợp chỉ cần một biến đổi rất nhỏ về cấu hình cũng đủ để làm mất hoạt tính protein. Hai tác nhân gây biến tính protein thường dùng là urea và guanidin- HCl. Một số dung môi cũng làm biến tính protein do nó phá vỡ các liên kết kị nước như các dung dịch nước của alcol hữu cơ. Nhiệt độ và pH cũng là các tác nhân gây biến tính protein.

Bảng 1.3 Khối lượng phân tử và điểm đẳng điện của một số protein

Protein	Khối lượng phân tử MW	Điểm đẳng điện pI
Cytochrome c	13 000	10,6
Ribonuclease	14 000	7,8
Myoglobin ở ngựa	17 000	7,0
Hormone tăng trưởng Somatotrophin ở người	21 500	6,9
Carboxypeptidease	34 000	6,0
Pepsin	35 500	< 1,0
Serum albumin ở người	66 500	4,8
Serum gamma-globulin	160 000	6,4-7,2
Fibrinogen	330 000	5,5
Hemocyanin ở bạch tuộc	2 800 000	-

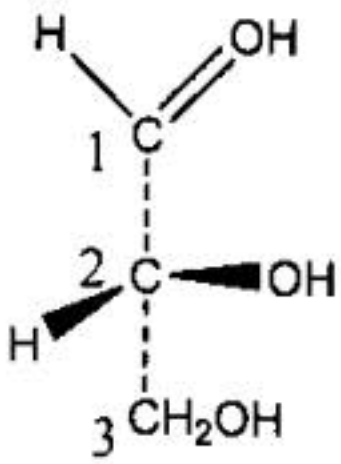
3. Đường và các polysaccharide

Các polysaccharide là loại vật liệu được tổng hợp nhiều nhất trong sinh quyển, trong đó đứng đầu là cellulose rồi đến chitin. Chúng đều được tạo thành từ các gốc glucose và có vai trò tạo cấu trúc cho tế bào thực vật và động vật. Các polysaccharide khác đóng vai trò tồn trữ năng lượng, nhận biết phân tử và tạo lớp vỏ bảo vệ tế bào.

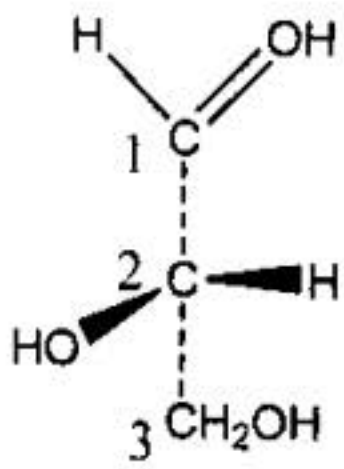
Monosaccharide

Monosaccharide là thành phần đơn giản nhất để cấu thành các loại polysaccharide, chúng bao gồm một nhóm aldehyde hay ketone và nhiều nhóm hydroxyl với công thức phân tử $(CH_2O)_n$ với n = 3 – 7. Carbohydrate nhỏ nhất khi n = 3 tương ứng với glyceraldehyde và dihydroxyacetol gọi chung là các triose.

Carbon số 2 có trung tâm bất đối (chiral center), từ đó có hai dạng đồng phân lập thể (stereoisomer). Tiếp đầu ngữ D và L dùng phân biệt hai dạng đó.



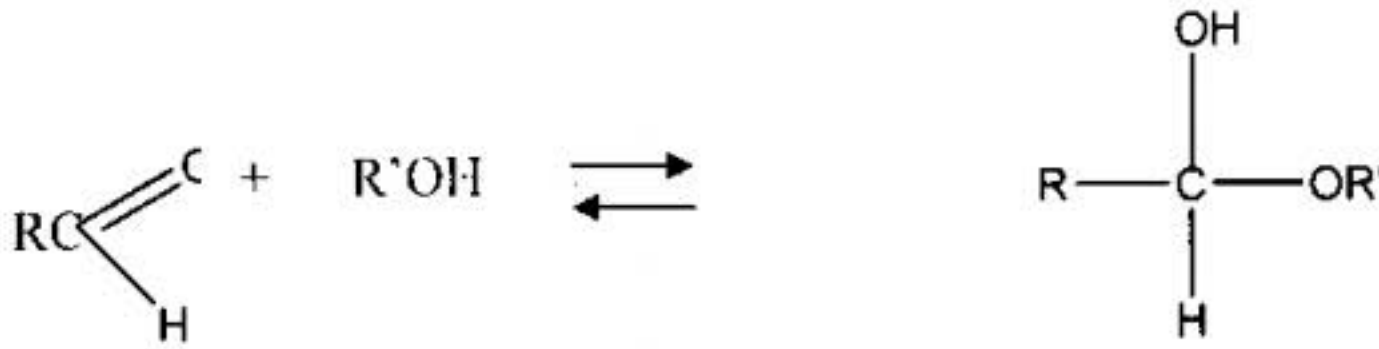
D-Glyceraldehyde



L-Glyceraldehyde

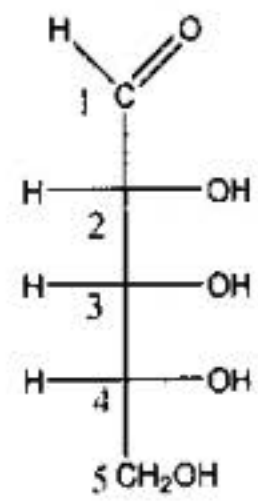
Hình 1.2 Cấu trúc phân tử D-Glyceraldehyde và L-Glyceraldehyde

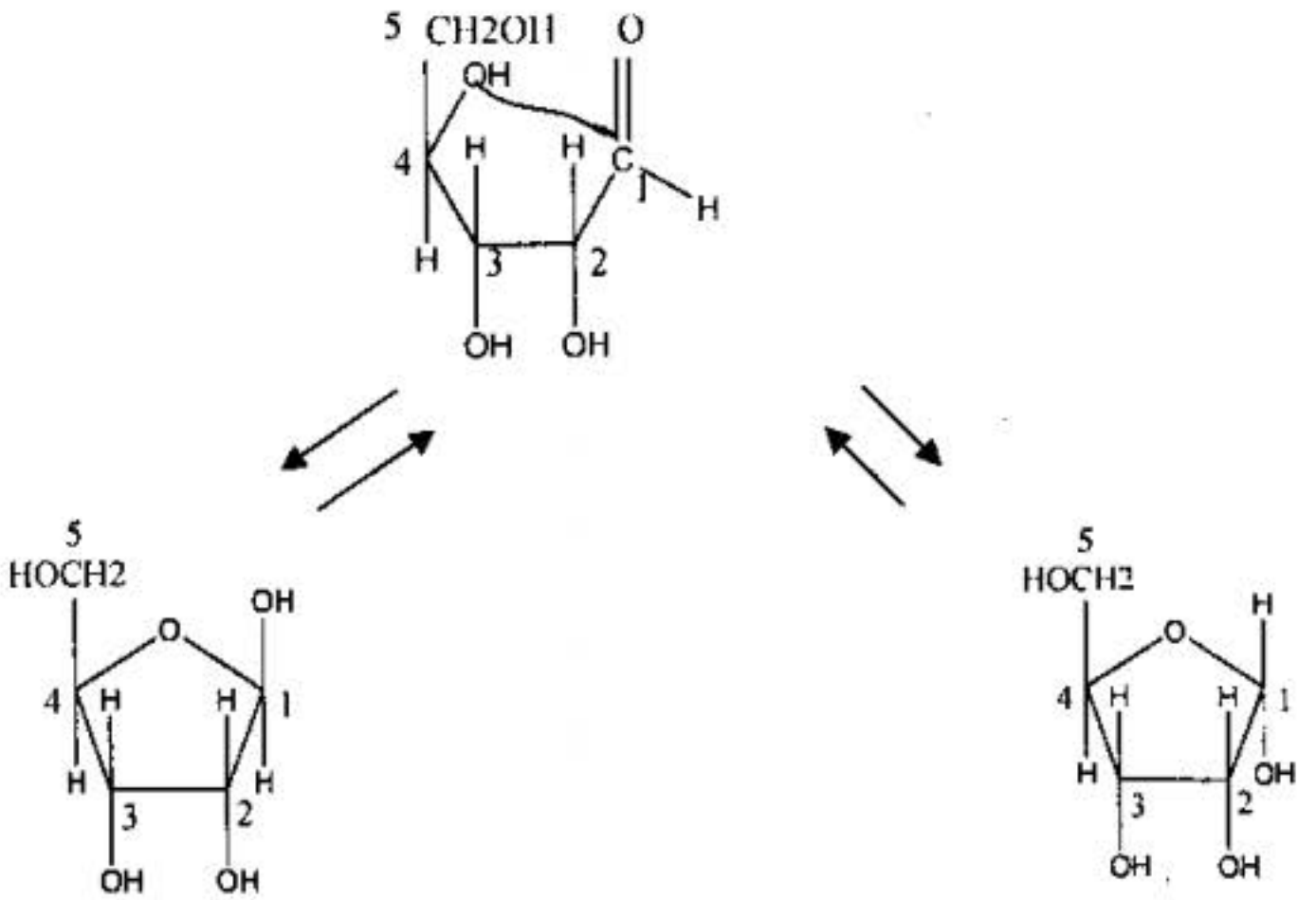
Các Monosaccharide có số carbon là 5 và nhiều hơn thường ở dạng vòng trong dung dịch. Vòng được tạo nên bởi phản ứng của nhóm aldehyde hay nhóm ketone ở một đầu phân tử với nhóm hydroxyl ở đầu kia. Phản ứng của nhóm aldehyde và nhóm hydroxyl tạo thành hemiacetal như sau:



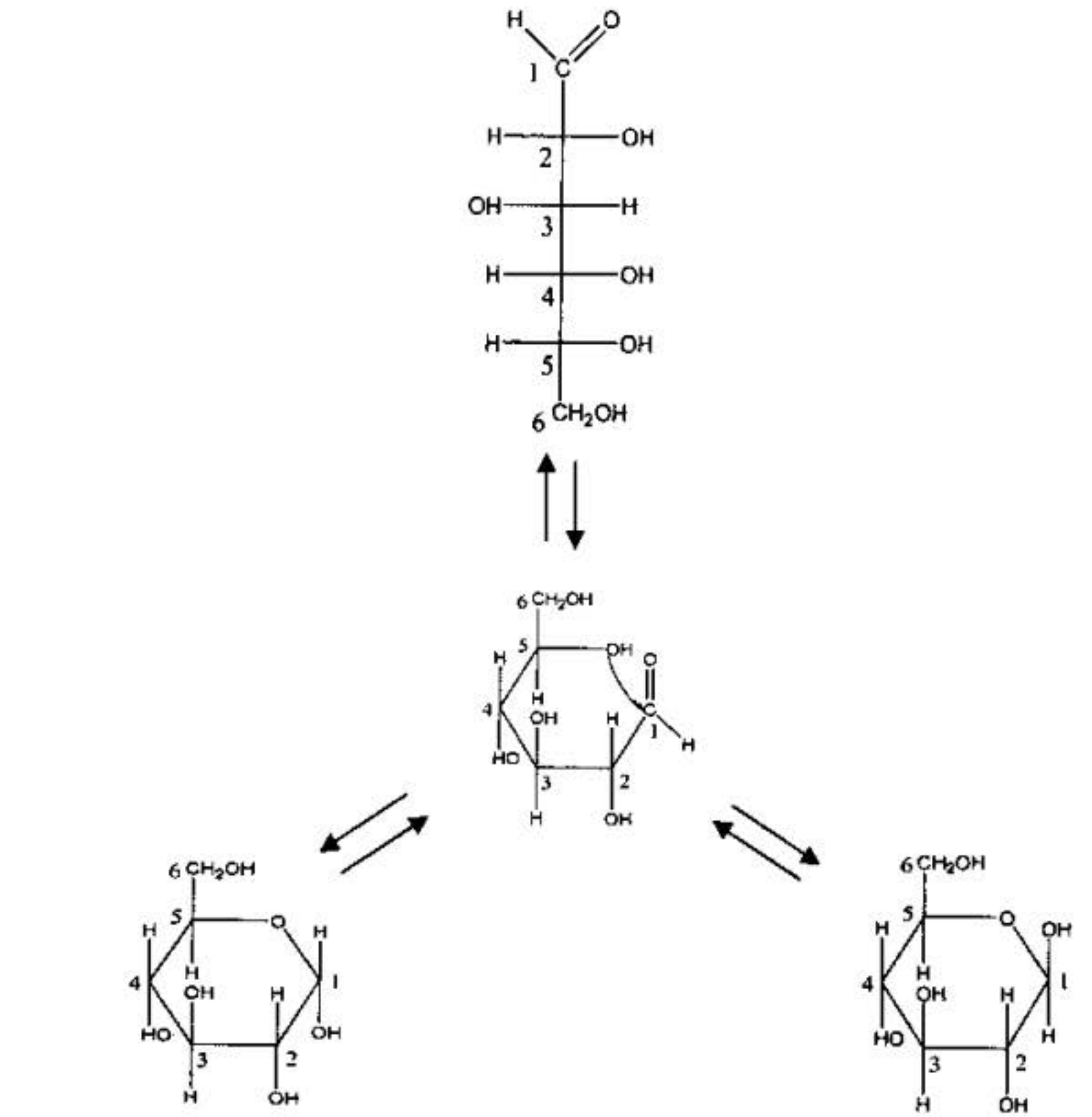
Aldehyde Alcohol Hemiacetal

Phản ứng tạo vòng của D ribose tạo thành các furanose. Phản ứng tương tự của glucose tạo thành các pyranose.





Hình 1.3 Phản ứng khép vòng tạo thành các furanose



Hình 1.4 Phản ứng khép vòng tạo thành các pyranose

Chú ý có sự chuyển tương hỗ giữa hai dạng α và β, ngoài ra vòng hemiacetal có thể mở vòng ra để tạo dạng aldehyde tự do và đóng vòng lại.

Đối với ketohexose D fructose, carbonyl tại C2 phản ứng với nhóm hydroxyl ở C5 tạo thành vòng hemiketal.

Đối với mỗi monosaccharide khi đã tạo vòng kín thì carbon carbonyl trước đây trở nên một trung tâm bất đối (chiral center). Do đó có thể rút ra 2 cấu trúc để biểu diễn các đồng phân lập thể. Ở cấu trúc thứ nhất, nhóm hydroxyl ở C1 (aldose) và C2 (ketose) ở dưới mặt phẳng vòng tạo thành cấu trúc α. Ở cấu trúc kia, nhóm hydroxyl ở trên mặt phẳng vòng tạo thành cấu trúc β. Hai dạng α và β gọi là các anomer vì chúng chỉ khác nhau về hoá học lập thể tại carbon anomeric (C1 ở glucose, C2 ở fructose).

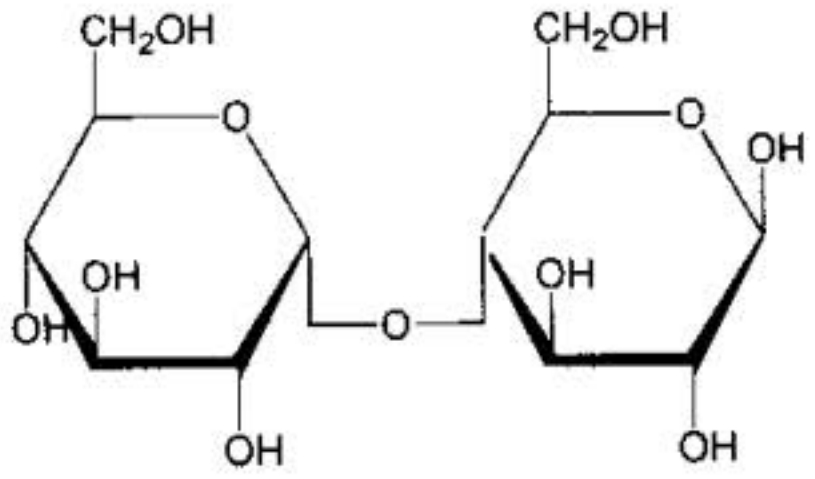
Khi hoà tan trong dung dịch nước, các dạng vòng của Monosaccharide nằm cân bằng với dạng mạch hở. Như thế dạng α của glucose có thể sẵn sàng chuyển sang dạng β. Quá trình chuyển tương hỗ giữa 2 dạng đồng phân lập thể gọi là sự quay tương hỗ (mutarotation).

Các dẫn xuất amin của đường

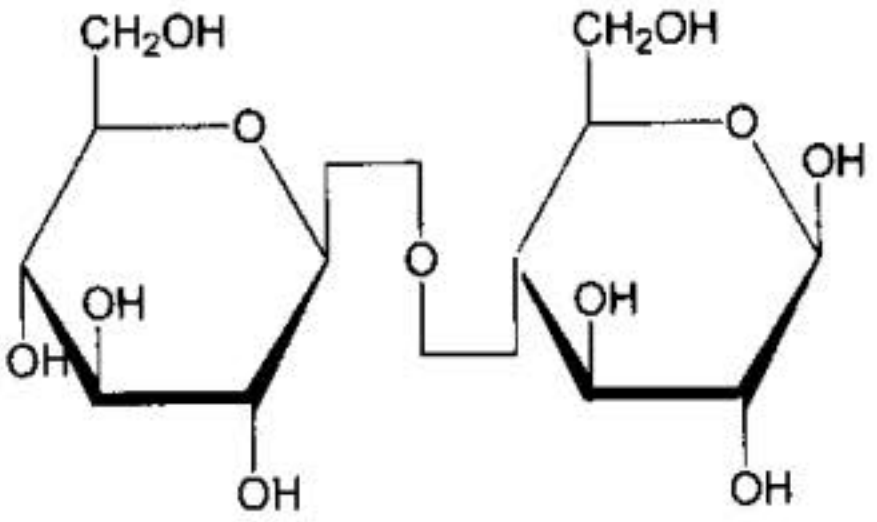
Sự thay thế một nhóm hydroxyl trong carbohydrate bằng một nhóm amin tạo thành các đường amin. Hai loại đường amin thường gặp trong tự nhiên là
D-2-aminoglucose (glucosamine) và D-2-aminogalactose (galactosamin). Glucosamin và dẫn xuất acetyl của nó, N-acetyl-glucosamin được tìm thấy trong thành phần cấu trúc vách tế bào vi sinh vật, trong thành phần của chitin, một polymer trong bộ xương ngoài của giáp xác, côn trùng.

Sự tạo thành glucoside

Khi carbohydrate phản ứng với nhóm hydroxyl ở điều kiện không có nước và acid yếu sẽ hình thành một liên kết mới là liên kết glycoside. Trong sản phẩm glycoside một glucose liên kết bởi nhóm hydroxyl anomeric của nó (C1) với nhóm hydroxyl của C4 của đơn vị glucose thứ hai. Khi cấu hình anomeric là α thì ta có liên kết gọi là α(1, 4) glycoside. Nếu cấu hình anomeric là β thì ta có liên kết β(1, 4) glycoside.



Maltose, liên kết α(1, 4) glycoside



Lactose, liên kết β(1, 4) glycoside

Polysaccharide

Trong tự nhiên các gốc đường liên kết với nhau thành các polysaccharide, có rất nhiều vai trò trong thực vật và động vật. Polysaccharide là polymer sinh học có tính đa dạng nhất. Thứ nhất là có rất nhiều gốc đường khác nhau và số lượng lớn hơn 20 acid amin của protein. Thứ hai là có 8 cách để liên kết hai gốc đường hexose trong một mạch polysaccharide nhưng đối với acid amin chỉ có một cách. Chính sự đa dạng này làm cho các oligomer và polysaccharide là các phân tử mang tín hiệu quan trọng trong hoá sinh. Chúng hoạt động như là các tín hiệu nhận biết của tế bào. Chẳng hạn như các nhóm máu A, B, O khác nhau là do gốc đường ở cuối mạch oligomer và nằm trên bề mặt tế bào. Trong các vi sinh vật, các phân tử đường nằm ở vách tế bào cũng xác định việc định danh tế bào. Khi nói đến protein, ta nói đến trình tự và cấu trúc nghiêm ngặt. Nhưng khi nói đến các polysaccharide, ta nói đến một họ các phân tử tương tự nhau nhưng có những khác biệt về cấu trúc ngay trên cùng một cá thể. Chính sự đa dạng của polysaccharide đã làm cho chúng trở thành một nhóm hợp chất có ứng dụng rất rộng rãi trong kĩ thuật và công nghiệp. Việc nghiên cứu chúng trở nên rất sôi động với các ứng dụng ngày càng phong phú trong một phổ rất rộng.

Polysaccharide có nguồn gốc từ các sinh vật biển có vai trò đặc biệt quan trọng. Trong số đó, phải kể đến các chất có nguồn gốc từ rong biển như alginat, agar và carageenan. Các polymer này có phổ ứng dụng rất rộng và ngày càng có ý nghĩa trong các nghiên cứu và ứng dụng thuộc lĩnh vực y sinh học và dược phẩm. Bên cạnh các loài rong biển lớn (macroalgae), hiện nay các polysaccharide từ vi tảo biển (marine microalgae) đang được chú ý vì tính đa dạng của chúng. Việc nuôi vi tảo cũng dễ kiểm soát hơn và cho năng suất lớn hơn. Trong môi trường biển, còn một nguồn sinh các polysaccharide đáng chú ý nữa là vi khuẩn. Các polysaccharide ngoại bào từ vi khuẩn (microbial exopolysaccharides) đang được các nhà khoa học chú ý do số lượng phong phú các loại vi khuẩn và các chất mà chúng sinh ra để tồn tại trong những điều kiện khắc nghiệt như ở các vùng biển sâu, các vùng địa cực, các vùng có độ muối rất cao...

Trong khuôn khổ của cuốn sách chúng ta sẽ lần lượt xét các polysaccharide quan trọng nhất từ rong biển và động vật biển là agar, alginate, carrageenan và chitin.

CHƯƠNG 2

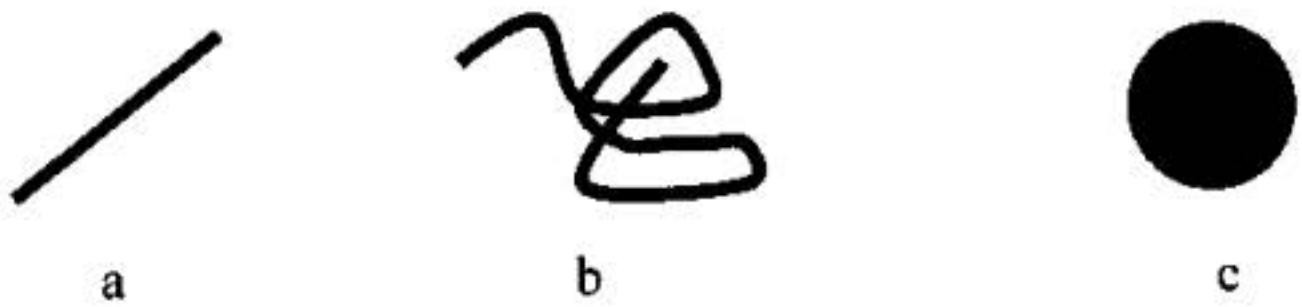
CẤU TRÚC, TÍNH CHẤT CỦA CÁC POLYMER SINH HỌC

1. Cấu hình của các polymer sinh học

Khi nghiên cứu về polymer sinh học, quan hệ tính chất – cấu trúc là một trong những vấn đề then chốt cần xác định và đây cũng là phần nghiên cứu khó nhất. Để có thể giải thích các tính chất đặc thù của một polymer sinh học, cần xây dựng mô hình không những của một polymer mà toàn bộ hệ thống. Do cấu trúc không đồng nhất, hệ các polymer sinh học có sự biến đổi tính chất trong một dải rộng và có tương tác rất phức tạp khi chịu tác động của các nhân tố khác nhau như loại dung môi hoà tan, lực ion, nhiệt độ. Để nghiên cứu một hệ thống như thế, phương pháp nhiệt động lực học có nhiều thuận lợi với các phương trình liên quan đến năng lượng và entropy.

a) Các thống kê chuỗi và bán kính hồi chuyển (Radius of gyration)

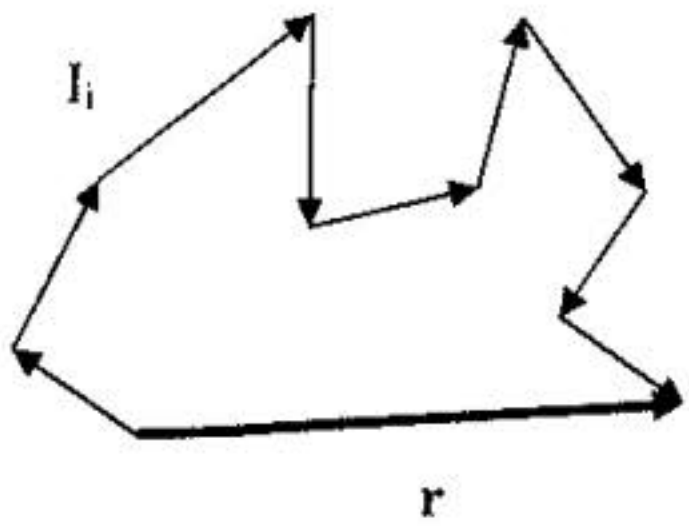
Một trong các nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến các tính chất vật lí, hoá sinh và ứng dụng kĩ thuật của polymer sinh học là cấu hình của chúng, nghĩa là hình dạng không gian của chuỗi phân tử. Cấu hình của một đại phân tử có thể chia ra ba dạng căn bản là hình cầu, hình gậy (rod) và hình cuộn mềm (flexible coil). Bên cạnh đó còn có các cấu hình trung gian giữa ba hình đó.



Hình 2.1 Các hình cơ bản của một đại phân tử: a. hình gậy, b. hình cuộn mềm c. hình cầu

Để đặc trưng cho cấu hình của các polymer, người ta dùng thông số bán kính hồi chuyển (radius of gyration), R_G. Bán kính hồi chuyển phụ thuộc vào khối lượng phân tử và cấu hình là hình cầu, hình gậy hay hình cuộn mềm của chuỗi phân tử. Cấu hình của các đại phân tử phụ thuộc vào nhiều nhân tố như liên kết hoá học giữa các đoạn dọc theo mạch, tương tác không gian giữa các monomer trong bộ khung của mạch phân tử. Nếu cấu trúc cấp hai chiếm ưu thế, cấu hình thu được là dạng gậy hoặc cầu. Nếu các lực tạo nên cấu trúc này yếu, phân tử sẽ có dạng mềm dẻo. Dạng này được xem như một cuộn ngẫu nhiên (random coil). Ta sẽ bắt đầu nghiên cứu cấu hình polymer từ dạng này để thấy bán kính hồi chuyển phụ thuộc vào khối lượng phân tử như thế nào.

Xét một phân tử với các cấu hình có thể tồn tại về mặt thống kê. Nếu tổng thể xem xét là một mole (6.10^{23}), sẽ khó có khả năng hai phân tử có cùng cấu hình tại một thời điểm. Cấu hình của một phân tử được xác định bởi hướng tương đối của các liên kết. Trường hợp thứ nhất, hướng của liên kết thứ i+1 không phụ thuộc vào hướng thứ i. Giả sử phân tử có 1000 liên kết và liên kết thứ i+1 có thể có 10 hướng khác nhau so với liên kết thứ i. Như vậy phân tử đang xét sẽ có số cấu hình khác nhau là 10^{1000}, một con số rất lớn, vượt quá số mole.



Hình 2.2 Một mạch phân tử biểu diễn như là chuỗi của các vectơ

Trường hợp thứ hai, hướng của liên kết thứ i+1 bị ảnh hưởng bởi liên kết thứ i. Nếu góc giữa các liên kết không đổi, ta sẽ có các cấu hình là chuỗi kéo căng hoàn toàn; chuỗi gấp khúc (ribbon) và chuỗi xoắn. Trong cấu hình cuộn ngẫu nhiên, một phân tử có thể cuộn chặt lại thành hình cầu hay một hình dạng xếp gọn khác. Tuy nhiên, dạng cầu hay dạng gậy chỉ có một cấu hình, nghĩa là trạng thái entropy thấp so với dạng cuộn ngẫu nhiên vì dạng này có nhiều cấu hình khác nhau với cùng mức năng lượng, nghĩa là entropy lớn hơn. Vì năng lượng tự do Gibbs $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, phân tử sẽ ưu tiên chọn mức năng lượng thấp (nghĩa là entropy cao), tức là cấu hình cuộn ngẫu nhiên.

Trong cấu hình gậy, góc giữa các liên kết giữ nghiêm ngặt dọc theo mạch, còn ở dạng cầu, các liên kết có thể quay quanh nó một số lần. Để đo kích thước của phân tử trong không gian, người ta đưa ra khái niệm khoảng cách (tính bằng vectơ) giữa hai đầu phân tử. Nếu gọi l_i là vectơ chỉ liên kết thứ i trong không gian ta có $r = \sum l_i$ và bình phương của nó là $r^2 = r.r = \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n} l_i l_j$ và giá trị trung bình căn thức của nó sẽ là $(r^2)^{1/2}$.

Bán kính hồi chuyển của một phân tử là khoảng cách từ trọng tâm khi giả định tất cả khối lượng tập trung trên một cái vỏ hình cầu mà không làm thay đổi bán kính hồi chuyển của các hạt. Đối với một hạt, ta có:

$$I = m.R_{Gh}^2$$

Với I là mômen quán tính hồi chuyển, R_{Gh} là bán kính hồi chuyển và m là khối lượng của một hạt. Xét một hệ gồm nhiều hạt xem như chất điểm m_i có khoảng cách r_i đến trọng tâm, ta có bán kính hồi chuyển của hệ là:

$$R_G^2 = \frac{\sum m_i.r_i^2}{\sum m_i} \qquad (2.3)$$

Và $R_G = (R_G^2)^{1/2}$

Nếu gọi M là khối lượng phân tử, khi tính toán bán kính hồi chuyển cho các cấu hình khác nhau ta có bán kính hồi chuyển trong trường hợp hình cầu tỉ lệ với căn bậc ba của khối lượng phân tử, $R_G \alpha M^{1/3}$, (α là kí hiệu tỉ lệ). Trong trường hợp hình gậy, bán kính hồi chuyển tỉ lệ bậc nhất, $R_G \alpha M$, còn trong trường hợp chuỗi mềm, nó tỉ lệ với bậc 0,5-0,6, $R_G \alpha M^{0,5\text{-}0,6}$

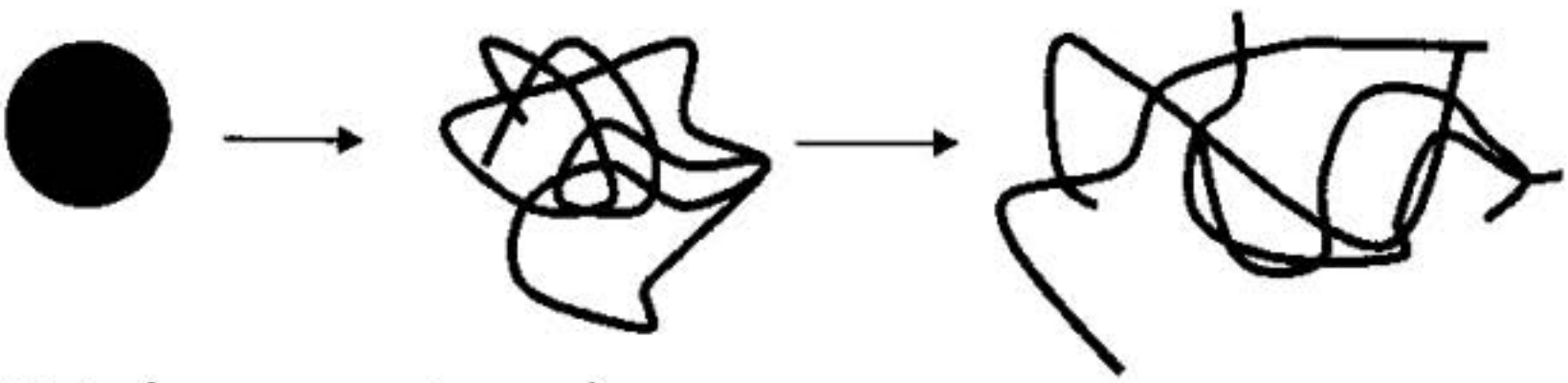
Trong các trường hợp trung gian giữa các cấu hình căn bản, R_G nhận giá trị giữa các giá trị nói trên.

b) Sự thay đổi cấu hình và sự kết hợp của các polymer

Khi nghiên cứu các polymer sinh học, vấn đề thay đổi cấu hình của chúng rất quan trọng. Do polymer sinh học có các cấp cấu trúc khác nhau và cấu trúc bậc cao tạo nên bởi các liên kết yếu, chúng rất dễ thay đổi cấu hình dưới tác dụng của ngoại lực. Khi hoà tan vào dung môi, khi tương tác với các polymer khác nhau, khi có mặt của các ion, dưới tác dụng của nhiệt độ, độ pH thay đổi đều liên quan đến sự thay đổi cấu hình của polymer. Khi hoà tan một polymer vào nước, về mặt nhiệt động lực học, ta nói nó chuyển từ trạng thái trật tự sang trạng thái hỗn độn hơn tức là entropy tăng lên. Tuỳ theo sự biến thiên của enthalpy và entropy ta có 4 trường hợp thay đổi cấu hình của polymer như sau:

Bảng 2.1 Biến tính polymer theo sự biến thiên của enthalpy và entropy

	$\Delta S > 0$	$\Delta S < 0$
$\Delta H > 0$	Biến tính nhiệt	Trạng thái luôn trật tự
$\Delta H < 0$	Trạng thái luôn hỗn độn	Biến tính do làm lạnh



Hình 2.3 Quá trình thay đổi cấu hình xuất hiện khi polymer sinh học bị biến tính

Khi tăng nhiệt độ và enthalpy, các polymer sẽ biến tính nhiệt, khi cả hai thông số đều giảm, ta có sự biến tính do làm lạnh.

Khi hoà tan polymer, ta chuyển nó từ trạng thái rắn vào dung dịch, tức là từ trạng thái trật tự sang trạng thái hỗn loạn. Khi enthalpy và entropy tăng, quá trình này sẽ được xúc tiến mạnh hơn. Khi cả hai đều âm, polymer sẽ kết tủa khi tăng nhiệt độ.

Các phân tử mềm dẻo thường có xu hướng chọn cấu hình ít trật tự hơn khi nóng chảy. Các phân tử rắn ngược lại chọn cấu hình trật tự và không tan. Trong tự nhiên, các chất cấu trúc là các phân tử rắn (stiff) điển hình như cellulose, chitin, polyguluronat (trong alginat) và pectin. Chúng tồn tại ở dạng không tan, tinh thể và tạo gel một phần trong cơ thể sinh vật. Đó là cách mà tự nhiên vận dụng các nguyên lí nhiệt động lực học để tạo nên cấu trúc vững chắc cơ học cho các mô động vật và thực vật.

c) Các cấp độ cấu trúc

Trong tự nhiên các đại phân tử tồn tại ở trạng thái năng lượng cực tiểu. Khi biết cấu trúc bậc một của một protein ta biết được các tương tác có thể giữa các phân đoạn, ta có thể tính toán năng lượng của một cấu hình. Bằng cách tính toán cho một loạt các cấu hình khác nhau, ta có thể tìm ra cấu hình có năng lượng thấp nhất và do đó cấu hình đó tồn tại và có hoạt tính sinh học. Tuy vậy về thực hành, hiện nay mới chỉ tiến hành được các phép tính cho các cấu hình đơn giản như polysaccharide hay một đoạn ngắn của protein và phải dùng các máy tính lớn. Các tính toán đó dù còn hạn chế nhưng giúp cho chúng ta hiểu biết về các cấu hình khác nhau.

Có bốn cấp độ cấu trúc của polymer sinh học. Cấu trúc cấp một nói lên trình tự của các monomer trong mạch phân tử. Cấu trúc cấp hai tạo nên do một phần của mạch hay cả mạch, ví dụ như cấu trúc xoắn. Cấu trúc bậc ba cho biết dạng hình học toàn bộ của một mạch phân tử và cấu trúc bậc bốn là sự liên kết của các mạch ở cấu trúc bậc hai để tạo thành một phân tử mới.

Chúng ta còn rất xa mới giải mã được cấu trúc bậc ba từ cấu trúc bậc một. Hiện nay đã biết được cấu trúc bậc một của 30 000 phân tử protein nhưng cấu trúc bậc ba mới chỉ biết có vài trăm. Các nhân tố chính ảnh hưởng đến việc ổn định cấu trúc của các polymer bao gồm:

– Dạng hình học cơ bản của bộ khung phân tử

– Sự quay hạn chế của các liên kết

– Các liên kết không phải đồng hoá trị

– Liên kết hydro

– Tương tác kị nước

– Tính đặc thù chìa khoá-ổ khoá.

Phần lớn các phản ứng sinh hoá là các phản ứng kết hợp (cooperative). Sự kết hợp này xảy ra giữa hai phân tử hay hai đoạn của cùng một phân tử. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc bẻ gãy liên kết đầu tiên là khó nhất, các liên kết sau xảy ra dễ dàng hơn. Để hiểu dễ dàng hơn, ta xét việc chuyển từ cấu hình cuộn ngẫu nhiên sang cấu hình xoắn của một protein hay polysaccharide theo mô hình "zipper". Trong mạch cuộn, liên kết tạo xoắn có thể xảy ra ở bất cứ vị trí nào trên mạch và quá trình chuyển cấu hình tiếp diễn lan truyền từ điểm này. Các phần của mạch xoắn phải diễn ra theo một dãy liên tiếp từ đầu mạch trở đi hay từ giữa mạch phát triển ra hai đầu. Do đó sẽ không có sự chuyển cấu hình từ nhiều nơi khác nhau trên mạch.

Trong tự nhiên, một tính chất quan trọng của polymer là chúng có thể liên kết với một phân tử nhỏ hay lớn (gọi là các ligand) tại một vị trí đặc biệt hay một vùng trên phân tử của chúng, gọi là vùng liên kết (binding site). Ví dụ như:

– Sự gắn O_2 lên phân tử hemoglobin

– Sự gắn cơ chất lên enzyme

– Sự gắn proton lên protein trong vi sinh vật

– Sự gắn ion kim loại để tạo gel trong polysaccharide như alginat hay carrageenan.

2. Tính chất vật lí của các polymer sinh học

a) Khối lượng phân tử và sự phân bố khối lượng phân tử

Đối với đa số các phân tử, nếu có cùng cấu trúc thì khối lượng phân tử là như nhau, nhưng đối với các polymer, khái niệm khối lượng phân tử có nhiều điểm cần bổ sung.

Thứ nhất, khi nói đến polymer là nói đến một tổng thể các phân tử có cấu trúc tương tự nhưng không hoàn toàn đồng nhất. Do đó không có một giá trị đơn nhất của khối lượng phân tử. Ở đây ta có một phân bố của khối lượng phân tử do các polymer có số lượng các monomer tạo thành nhiều ít khác nhau. Thứ hai, các polymer sinh học thường có các biến đổi trong cấu tạo của các monomer, làm cho khối lượng phân tử thay đổi. Chính hai lí do đó làm cho việc nghiên cứu khối lượng phân tử polymer trở nên khó khăn. Độ dài ngắn khác nhau của các mạch phân tử cùng với sự phân bố khác nhau của các monomer làm cho tính chất của các polymer thay đổi trong một khoảng rộng. Chính điều này tạo nên các ứng dụng đa dạng của các polymer nhưng đồng thời cũng làm cho việc nghiên cứu và sản xuất các polymer sinh học trở nên khó khăn. Khó khăn thứ nhất liên quan đến sự phân bố của các monomer trong mạch phân tử. Khó khăn thứ hai là khó kiểm soát sự phân bố của khối lượng phân tử. Trong nhiều thập niên, các nhà khoa học đã có nhiều cố gắng trong việc kiểm soát cả hai tính chất trên nhưng đối với một số polymer như chitin, nhiều việc còn đang ở phía trước.

Chính đặc điểm của các polymer như vậy khiến ta cần đến các khái niệm thống kê khi muốn đặc trưng tính chất của các polymer. Một mẫu gồm có các polymer có khối lượng phân tử như nhau gọi là đơn phân tán (monodisperse). Một mẫu chứa các phân tử có khối lượng phân tử khác nhau gọi là đa phân tán (polydisperse). Để đặc trưng cho khối lượng phân tử của các polymer, người ta dùng các khái niệm khối lượng phân tử trung bình. Mỗi phương pháp đo khác nhau liên quan đến giá trị trung bình khác nhau.

Khối lượng phân tử trung bình số (number average):

$$\overline{M_n} = \frac{\sum N_i M_i}{N_i} \qquad (2.4)$$

Trong đó N_i là số phân tử có khối lượng M_i.

Khi phân bố lệch khái niệm này sẽ gây sai lạc nhiều do ảnh hưởng của các phân tử nhỏ lên giá trị trung bình.

Khối lượng phân tử trung bình khối (weight average)

Theo cách tính này, các phân tử giống nhau được phân thành các lớp với khối lượng của lớp là $w_i=N_iM_i$

$$\overline{M_w} = \frac{\sum w_i M_i}{\sum w_i} = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i} \qquad (2.5)$$

Khối lượng phân tử trung bình z (z-average)

$$\overline{M_z} = \frac{\sum N_i M_i^3}{\sum N_i M_i} \qquad (2.6)$$

Đối với tổng thể đơn phân tán của các phân tử, ba đại lượng trung bình là như nhau:

$$\overline{M_n} = \overline{M_w} = \overline{M_z}$$

Còn trong hệ đa phân tán thì:

$$\overline{M_n} < \overline{M_w} < \overline{M_z}$$

Từ đó người ta đưa ra khái niệm chỉ số đa phân tán (polydispersity index) là $p.i = \frac{\overline{M_w}}{\overline{M_n}}$, đối với hệ đơn phân tán thì p.i = 1 và chỉ số này tăng khi mức độ đa phân tán tăng.

b) Nhiệt động lực học của các dung dịch loãng

Định nghĩa dung dịch loãng

Thuật ngữ dung dịch loãng không dựa trên một định nghĩa rõ ràng. Đối với các polymer mềm dẻo (flexible) một dung dịch loãng có nồng độ nhỏ hơn nồng độ c^* (tạm dịch là nồng độ chồng lấp tới hạn, critical overlap concentration). Tại nồng độ đó, thể tích của các cuộn polymer lấp đầy toàn bộ thể tích dung dịch. Nồng độ c* được cho bằng công thức:

$$c^* = \frac{2,5}{[\eta]} \qquad (2.7)$$

Với các cuộn ngẫu nhiên và $[\eta]$ là độ nhớt nội. Trong thực hành giá trị của c* thay đổi từ 1 đến 4.

Các đại lượng riêng phần

Để có thể hiểu được phần này, cần có các kiến thức của nhiệt động lực học. Nó giúp cho việc hình thành nền tảng kiến thức để tiên đoán một quá trình nào đó có thể xảy ra hay không. Nó cũng là cơ sở cho các kĩ thuật thí nghiệm như thẩm thấu và nhiễu xạ.

Ở đây cần nhắc lại một số khái niệm.

Các tính chất cường độ (intensive properties) là các tính chất không phụ thuộc vào lượng vật chất chứa trong hệ thống. Ví dụ như nhiệt độ, áp suất, mật độ, và nhiệt dung riêng.

Các tính chất khuếch độ (extensive properties) là các tính chất phụ thuộc vào lượng vật chất đang nghiên cứu. Ví dụ như khối lượng, năng lượng tự do Gibbs, enthalpy và entropy.

Enthalpy $H = E + pV$ với E là nội năng

Năng lượng Gibbs $G = H - TS$

Khi xét một thông số khuếch đại bất kì, đại lượng mol riêng phần, kí hiệu $\overline{X_i}$, là:

$$\overline{X_i} = \left(\frac{\partial X}{\partial n_i}\right)_{T,P,i\neq j} \qquad (2.8)$$

Trong đó n_i là số mol của cấu tử thứ i, áp suất và nhiệt độ được giữ không đổi. Ví dụ khi xét đại lượng thể tích mol thành phần $\overline{V_i}$

$$\overline{V_i} = \left(\frac{\partial V}{\partial n_i}\right)_{T,P,i\neq j} \qquad (2.9)$$

Đại lượng này có thể thu được khi đo sự tăng của V theo n trong một hệ nhiều thành phần.

Đại lượng mol riêng phần quan trọng nhất trong hoá học là hoá thế (chemical potential) kí hiệu là μ_i, nó chính là năng lượng Gibbs mol thành phần, $\overline{G_i}$:

$$\mu_i = \overline{G_i} = \left(\frac{\partial G}{\partial n_i}\right)_{T,P,i\neq j} \qquad (2.10)$$

Có nhiều khi ta không biết khối lượng phân tử và do đó không biết số mol nhưng ta có thể cân để biết khối lượng, từ đó người ta đưa ra các đại lượng riêng phần (theo khối lượng, partial specific quantities):

$$\overline{x_i} = \left(\frac{\partial X}{\partial w_i}\right)_{T,P,i\neq j} \qquad (2.11)$$

Ví dụ thể tích riêng phần $\overline{v_i}$

$$\overline{v_i} = \left(\frac{\partial V}{\partial w_i}\right)_{T,P,i\neq j} \qquad (2.12)$$

Quan hệ giữa đại lượng mol thành phần và đại lượng riêng phần rất đơn giản:

$\overline{x_i} = \dfrac{X_i}{M_i}$ như trong trường hợp thể tích $\overline{v_i} = \dfrac{\overline{V_i}}{M_i}$ với M_i là khối lượng phân tử của thành phần thứ i.

Tính chất khuếch độ có tính chồng chất, do đó có thể tính theo biểu thức:

$$X = \sum_i n_i \overline{X_i}$$

Ví dụ $V = \sum_i n_i \overline{V_i}$ và $G = \sum_i n_i \mu_i$

Đối với dung dịch loãng, thể tích mol thành phần của dung môi (thành phần 1) sẽ không đổi và bằng thể tích mol của dung môi:

$$\overline{V_i} \approx V_i^o$$

Tương tự: $\overline{v_2} \approx v_2$

Với $v_2 = \dfrac{V_2}{w_2}$

Khi hỗn hợp n cấu tử ta có:

$$\Delta G_{hh} = G_{dd} - \sum_i G_i \qquad (2.13)$$

$$\Delta H_{hh} = H_{dd} - \sum_i H_i \qquad (2.14)$$

$$\Delta S_{hh} = S_{dd} - \sum_i S_i \qquad (2.15)$$

Với hh: hỗn hợp, dd: dung dịch, i cấu tử tinh khiết thứ i.

Theo công thức thống kê của Boltzman, entropy của một hệ thống là hàm của số các cách phân bố của các phần bé (phân tử) trong hệ thống:

$$S = k \ln \Omega$$

Với k là hằng số Boltzman và Ω là số các trạng thái vi mô. Áp dụng cho entropy của một hỗn hợp theo công thức trên:

$$\Delta S_{hh} = k \ln \Omega_{dd} - \sum_i k \ln \Omega_i \qquad (2.16)$$

Trong cùng một cấu tử không phân biệt các phân tử, do đó $\Omega_{i\ (\text{cấu tử tinh khiết})} = 1$, và $\sum_i k \ln \Omega_i = 0$

Đối với dung dịch, trong trường hợp có n cấu tử, cấu tử thứ i có N_i phân tử, hệ thống có tất cả N_0 phân tử thì:

$$N_0 = N_1 + N_2 + ... + N_n = \sum N_i$$

Thì số trạng thái vi mô sẽ là: $\Omega = \frac{N_0!}{N_1!N_2!...N_n!}$

Khi đó ta có thể viết entropy của hỗn hợp:

$$\Delta S_{hh} = k \ln \frac{N_0!}{N_1!N_2!...N_n!} \qquad (2.17)$$

Áp dụng công thức Stirling: $\ln X! = X \ln X - X$

Ta có:

$$\Delta S_{hh} = k(\ln N_0! - \ln N_1! - ... - \ln N_n!)$$
$$= k(N_0 \ln N_0 - N_0 - N_1 \ln N_1 + N_1 - N_2 \ln N_2 + N_2 - ... + N_n)$$

Vì $N_0 = \sum_i N_i$

Suy ra:

$$\Delta S_{hh} = k(\sum_i N_i \ln N_0 - \sum_i N_i \ln N_i)$$

$$\Delta S_{hh} = -k(\sum_i N_i \ln \frac{N_i}{N_0}) = -k \sum_i N_i \ln X_i \qquad (2.18)$$

Với X_i là thành phần mol (mole fraction) của cấu tử thứ i. Theo định luật của khí lí tưởng: $R = N_A.k$ với N_A là hằng số Avogadro, thay vào phương trình trên với số mol $n_i = \frac{N_i}{N_0}$, ta có:

$$\Delta S_{hh} = -R \sum_i n_i \ln X_i \qquad (2.19)$$

Vì rằng X_i luôn nhỏ hơn 1 nên biến thiên entropy luôn dương.

Dung dịch lí tưởng

Chúng ta định nghĩa dung dịch lí tưởng như sau:

$$\Delta H_{hh} = 0$$

$$\Delta S_{hh} = -R \sum_i n_i \ln X_i$$

Ta có hoá thế của hỗn hợp:

$$\Delta G_{hh} = -T\Delta S_{hh} = RT\sum_i n_i \ln X_i$$

$\Delta G_{hh} = G_{dd} - \sum_i G_i$ với $G_i = \sum_i n_i\mu_i$ thay vào ta có:

$$\Delta G_{hh} = \sum_i n_i\mu_i - \sum_i n_i\mu_i^0 = \sum_i n_i(\mu_i - \mu_i^0) \qquad (2.20)$$

Với μ_i^0 là hoá thế của cấu tử tinh khiết thứ i ở điều kiện chuẩn. Cân bằng hai phương trình ta có:

$$\mu_i - \mu_i^0 = RT\ln X_i$$

Do $X_i < 1$ nên $\mu_i < \mu_i^0$ khi trộn.

Dung dịch đều

Dung dịch đều được định nghĩa:

$$\Delta H_{hh} = 0$$

$$\Delta S_{hh} \neq -R\sum_i n_i \ln X_i$$

Trường hợp này thường xảy ra với dung dịch cao phân tử, khi khối lượng phân tử của polymer rất lớn hơn dung môi.

Dung dịch thực

$$\Delta H_{hh} \neq 0$$

$$\Delta S_{hh} \neq -R\sum_i n_i \ln X_i$$

Ta phân ra 3 trường hợp: exothermal, endothermal và athermal.

Trộn exothermal: $\Delta H_{hh} < 0$ nhiệt thải ra khi trộn. Dung môi trong trường hợp này gọi là dung môi tốt cho chất được hoà tan. Trong trường hợp hai cấu tử, lực liên kết giữa hai cấu tử 1 và 2 lớn hơn giữa 1-1 và 2-2.

Trộn endothermal: $\Delta H_{hh} > 0$ nhiệt được hấp thụ khi trộn. Dung môi khi đó là không tốt cho cấu tử cần hoà tan.

Trộn athermal: $\Delta H_{hh} = 0$ nhiệt không toả ra cũng không hấp thụ. Lực liên kết giữa dung môi và chất tan giữ nguyên như khi là cấu tử tinh khiết.

Dung dịch polymer

Đối với dung dịch lí tưởng ta có:

$$\mu_1 = \mu_1^0 + RT \ln X_1 \qquad (2.21)$$

Ta sẽ biến đổi cho công thức trên có tính ứng dụng hơn.

Thay thành phần mol của dung môi bằng thành phần mol của chất tan, $X_1 = 1 - X_2$, ta có

$$\mu_1 = \mu_1^0 + RT \ln(1 - X_2)$$

Biến đổi hàm ln dưới dạng chuỗi

$$\ln(1 - X_2) = -X_2 - \frac{1}{2}X_2^2 - \frac{1}{3}X_3^2 - \ldots$$

$$\mu_1 - \mu_1^0 = -RT(X_2 + \frac{1}{2}X_2^2 + \ldots) \qquad (2.22)$$

Một lần nữa ta thấy hoá thế giảm đi khi thêm thành phần thứ hai. Phương trình này tuy vậy chưa có tính ứng dụng vì ta không biết khối lượng phân tử, do đó cần chuyển qua nồng độ khối lượng c_2 theo g/ml hay g/100ml, ta cần biết quan hệ giữa c_2 và X_2. Vì dung dịch loãng nên:

$$n_2 << n_1 \text{ nên } X_2 = \frac{n_2}{n_1 + n_2} = \frac{n_2}{n_1}$$

Đối với dung dịch loãng $\overline{V_1} \approx V_1^0$ với V_1^0 là thể tích mol của dung môi tinh khiết. Thể tích toàn phần của dung môi là $V_1 = n_1 \overline{V_1} \approx n_1 V_1^0$ ta có:

$$X_2 = \frac{n_2}{n_1} = \frac{n_2}{V_1 / \overline{V_1}} = \frac{n_2}{V_1 / V_1^0}$$

Với $n_2 = \frac{w_2}{M_2}$ với w_2 là khối lượng tính bằng gam với khối lượng phân tử M_2.

$X_2 = \frac{w_2 / M_2}{V_1 / V_1^0}$ vì nồng độ khối lượng $c_2 = \frac{w_2}{V_1}$ suy ra

$$X_2 = \frac{c_2 . V_1^0}{M_2}$$

Thế vào phương trình trên, ta có: $\mu_1 - \mu_1^0 = -RT[\frac{c_2 V_1^0}{M_2} + \frac{1}{2}\left(\frac{c_2 V_1^0}{M_2}\right)^2 + ...]$

Hay ở dạng thông dụng hơn:

$$\mu_1 - \mu_1^0 = -RTV_1^0 c_2 \left(\frac{1}{M_2} + \frac{1}{2}\frac{V_1^0}{M_2^2} c_2 + ...\right) \qquad (2.23)$$

Phương trình này cho ở dạng chuỗi với số hạng virial bậc nhất là $1/M_2$. Phương trình này rất quan trọng vì nó cho biết quan hệ giữa hoá thế của dung môi với nồng độ và phân tử của polymer hoà tan. Ta có thể thấy các số hạng trong ngoặc tiến đến $1/M_2$ khi c_2 tiến đến không.

Bằng cách ngoại suy đến nồng độ vô cùng loãng ta có thể thu được giá trị khối lượng phân tử của polymer. Phương trình cũng cho thấy độ giảm hoá thế càng ít khi khối lượng phân tử càng lớn. Điều này cũng cho thấy tại sao các phương pháp chuẩn cho các phân tử nhỏ không dùng được cho cao phân tử.

Dung dịch cao phân tử thường được đặc trưng lệch khá lớn so với dung dịch lí tưởng do hai nhân tố

$$\Delta S_{hh} \neq -R\sum_i n_i \ln X_i$$

$$\Delta H \neq 0$$

Tương tự như các chất khí trở nên lí tưởng khi rất loãng, dung dịch cao phân tử cũng trở nên lí tưởng khi rất loãng. Trong nhiệt động lực học ta thường dùng khái niệm hoạt độ a để giữ nguyên dạng của phương trình

$$\mu_1 - \mu_1^0 = -RT \ln a_i \qquad (2.24)$$

Với $a_i = \gamma_i C_i$, $\lim_{c_i \to 0} \gamma_i = 1$ với γ_i là hệ số hoạt độ, C_i là nồng độ.

Ta cũng có thể định nghĩa hoạt độ theo thành phần mol hay nồng độ khối lượng:

$$a_{ix} = f_i X_i, \quad \lim_{x_i \to 0} f_i = 1$$

$$a_{ic} = \gamma_i c_i, \quad \lim_{c_i \to 0} \gamma_i = 1$$

Tương tự ta có phương trình giữ nguyên dạng nhưng các hệ số trước các số hạng nồng độ khác giá trị :

$$\mu_1 - \mu_1^0 = -RTV_1^0 c_2 \left(\frac{1}{M_2} + A_2 c_2 + A_3 c_2^2 + ... \right) \qquad (2.25)$$

Với $1/M_2$: hệ số virial thứ nhất

A_2 : hệ số virial thứ hai

A_3 : hệ số virial thứ ba

Ở nồng độ rất thấp khi các số hạng A_2c_2 và $A_2c_2^2$ rất nhỏ cả hai phương trình (a) và (b) trở nên đồng nhất.

Để giải thích độ sai lệch của các dung dịch polymer so với điều kiện lí tưởng, cần tìm liên quan giữa các cấu hình của các phân tử đến các hệ số virial bậc hai, A_2.

Ở đây sử dụng các khái niệm về cấu hình của các polymer là dạng hình cầu, dạng thanh và dạng mềm dẻo (flexible).

Ở điều kiện lí tưởng

$$A_2 = \frac{1}{2} \frac{V_1^0}{M_2^2}$$

Vì giá trị của M_2 rất lớn đối với cao phân tử, suy ra A_2 có giá trị rất nhỏ. Theo Tanford (1961, p.192), đối với dung dịch loãng, loại đều (regular), có thể biểu diễn hoá thế của dung môi như sau:

$$\mu_1 - \mu_1^0 = -RTV_1^0 c_2 \left(\frac{1}{M_2} + c_2 . \frac{N.u}{2M_2^2} \right) \qquad (2.26)$$

Với u là thể tích loại trừ (excluded volume) của mỗi phân tử chất tan. Có thể thấy hoá thế của dung môi giảm khi u lớn. Nếu xem gần đúng $N.u \approx V_1^0$, ta có:

$$A_2 = \frac{N.u}{2M_2^2} \approx \frac{1}{2} \frac{V_1^0}{M_2^2}$$

Đối với polymer trong dung dịch có cấu hình dạng cầu:

$$A_2 = \frac{16\pi}{3} \frac{R^3 N}{M_2^2} \qquad (2.27)$$

Với cấu hình dạng thanh: $A_2 = \frac{L}{d} \frac{\overline{v_2}}{M_2}$ (2.28)

Vậy A_2 dạng thanh lớn hơn dạng hình cầu

Đối với dạng mềm dẻo, khi đó polymer cuộn lại như hình cầu:

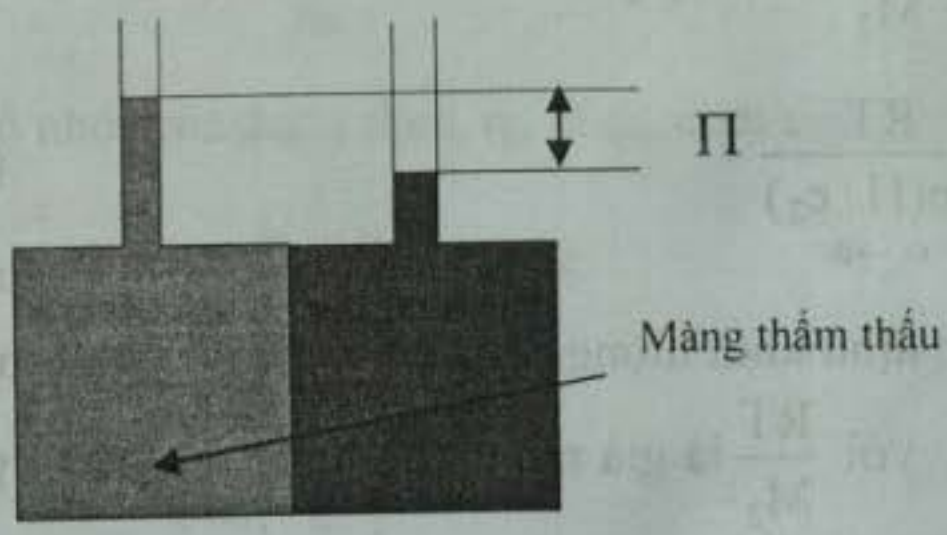
$A_2 = \frac{16\pi}{3}\frac{N}{M_2^2}.\gamma^3.R_G^3$, trong đó γ là hàm của độ tốt của dung môi khi hoà tan, có giá trị từ 0,5 đến 0,9 đối với dung môi đều và dung môi tốt, và tiến đến không khi hoà tan kém.

Bảng 2.2 Giá trị xấp xỉ của hệ số virial thứ hai theo các cấu hình khác nhau của polymer trong dung dịch

Cấu hình	Dạng cầu	Dạng thanh	Dạng mềm dẻo
Giá trị A_2 xấp xỉ, $ml.mol/g^2$	3.10^{-5}	10^{-3}	$1\text{-}5.10^{-4}$

Cân bằng màng, sự thẩm thấu

Khối lượng phân tử và hệ số virial thứ hai có thể xác định bằng cách đo hiệu số hoá thế giữa dung dịch và dung môi tinh khiết. Điều này có thể thực hiện trên thiết bị thẩm thấu màng và đo hiệu số áp suất Π giữa dung môi và dung dịch. Trong thiết bị đó, dung môi có thể thấm qua màng nhưng các phân tử polymer bị giữ lại. Kĩ thuật này chỉ áp dụng cho polymer có khối lượng phân tử trung bình. Nếu khối lượng phân tử nhỏ hơn 10 000 sẽ thấm qua màng, nếu lớn hơn 500 000 thì hiệu số áp suất sẽ rất nhỏ khó đo được.



Hình 2.4 Áp suất thẩm thấu qua màng

Nếu gọi $\mu(\alpha)$ là hoá thế phía dung dịch, $\mu(\beta)$ là hoá thế phía dung môi thì $\mu(\alpha) < \mu(\beta)$ do đó dung môi sẽ thấm từ bên dung môi qua dung dịch cho đến khi hiệu số áp suất Π được thiết lập để làm ngừng quá trình.

Để tính được áp suất này ta cần thiết lập quan hệ giữa hoá thế và áp suất.

$$\left(\frac{\partial G}{\partial P}\right)_T = V \quad \text{và} \quad \left(\frac{\partial \mu}{\partial P}\right)_T = \overline{V}$$

Sự thay đổi hoá thế từ P_0 đến $P_0 + \Pi$ là:

$$\Delta\mu_1^P = \int_{P_0}^{P_0+\Pi} \left(\frac{\partial \mu}{\partial P}\right) dP = \int_{P_0}^{P_0+\Pi} \overline{V_1} dP$$

Vì dung dịch loãng nên: $\overline{V_1} \approx V_1^0$

Với $\overline{V_1^0}$ là thể tích mol của dung môi. Ở dung dịch loãng, nó không thay đổi theo áp suất nên tích phân ở trên thu được:

$$\Delta\mu_1^P = V_1^0.\Pi = RTV_1^0 c_2 \left(\frac{1}{M_2} + A_2 c_2 + \ldots\right)$$

Khi nồng độ rất loãng các số hạng sau của chuỗi tiến nhanh đến không nên ta có:

$$\frac{\Pi}{c_2} \approx \frac{RT}{M_2} + RTA_2 c_2$$

Suy ra: $$M_2 = \frac{RT}{\lim\limits_{c_2 \to 0}(\Pi / c_2)} \qquad (2.29)$$

Do đó có thể xác định khối lượng phân tử và hệ số virial thứ hai bằng đồ thị giữa Π / c_2 và c_2 với $\frac{RT}{M_2}$ là giá trị tại điểm cắt trục tung và $RTA_2 c_2$ là độ dốc đường thẳng.

c) Độ nhớt của dung dịch polymer

Các định nghĩa cơ bản

Theo định nghĩa của Newton, độ nhớt của một dung dịch là hệ số trong phương trình:

$$\sigma = \eta \frac{d\gamma}{dt} = \eta . \dot{\gamma} \qquad (2.30)$$

Với σ là ứng suất tiếp, η là hệ số độ nhớt và $\dot{\gamma}$ là tốc độ trượt.

Những chất lỏng có độ nhớt không phụ thuộc vào tốc độ trượt gọi là chất lỏng Newton. Ngược lại, những chất lỏng có độ nhớt thay đổi theo tốc độ trượt gọi là chất lỏng phi Newton. Đa số các polymer sinh học là các chất lỏng phi Newton. Nồng độ dung dịch càng lớn, độ lệch so với dòng chảy Newton càng lớn.

Khi độ nhớt tăng theo tốc độ trượt, ta có chất lỏng trương nở (dilatant), ngược lại khi độ nhớt giảm với sự tăng tốc độ trượt, ta có chất lỏng giả dẻo (pseudoplastic). Các động thái khác nhau đó bộc lộ đáp ứng của các polymer dưới tác dụng của tốc độ trượt ở các mức khác nhau. Các phân tử của chúng đã co lại hoặc duỗi ra (thay đổi cấu hình) và thay đổi mức độ tụ tập dưới các ứng suất khác nhau và làm thay đổi độ nhớt.

Trong nghiên cứu tính chất của polymer, người ta thường chú trọng đến các dung dịch loãng, qua đó tìm quan hệ giữa độ nhớt với các đặc trưng của cấu hình và khối lượng phân tử của polymer. Để đi sâu vào vấn đề này, trước hết cần nắm được các định nghĩa về các độ nhớt khác nhau.

Độ nhớt tương đối: $\eta_r = \frac{\eta_s}{\eta_0}$ (2.31)

Với η_s là độ nhớt của dung dịch, η_0 là độ nhớt của dung môi.

Độ nhớt riêng: $\eta_{sp} = \frac{\eta_s - \eta_0}{\eta_0} = \eta_r - 1$ (2.32)

Độ nhớt nội: $[\eta] = \lim_{c \to 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{c} \right)$ (2.33)

Độ nhớt nội có thể xác định bằng thực nghiệm bằng cách đo η_r ở các nồng độ khác nhau và vẽ đồ thị giữa η_{sp}/c theo c, điểm cắt trục tung sẽ cho giá trị độ nhớt nội (tương ứng khi $c \to 0$).

Dưới đây là bảng liệt kê các định nghĩa độ nhớt khác nhau theo IUPAC. Do có một số khái niệm mới tạm dịch, chúng tôi xin đính kèm bằng tiếng Anh.

Bảng 2.3 Tên gọi và định nghĩa các loại độ nhớt

Tên theo IUPAC	Tên thông dụng	Định nghĩa	Kí hiệu	Đơn vị
Tỉ số độ nhớt (Viscosity ratio)	Độ nhớt tương đối (Relative viscosity)	η / η_0	η_{rel}	Không thứ nguyên
Độ nhớt riêng (Specific viscosity)	Độ nhớt riêng (Specific viscosity)	$\eta / \eta_0 - 1$	η_{sp}	Không thứ nguyên
Số độ nhớt (Viscosity number)	Độ nhớt suy biến (Reduced viscosity)	η_{sp} / c	η_{red}	decilit/gram
Số độ nhớt logarit (Logarithmic viscosity number)	Độ nhớt bản chất Inherent viscosity	$\ln \eta_{rel} / c$	η_{inh}	decilit/gram
Số độ nhớt giới hạn (Limiting viscosity number)	Độ nhớt nội (Intrinsic viscosity)	$\lim_{c\to 0}(\eta_{sp} / c)$ $\lim_{c\to 0}(\ln \eta_{ret} / c)$	$[\eta]$	decilit/gram
Độ nhớt tuyệt đối (Absolute viscosity)			P Pa.s	Poise (dynes · s/cm) Pascal · giây (Newton · s/m^2)
Độ nhớt động học (Kinematic Viscosity)			St	Stokes (m^2/s)

Để đi sâu về vấn đề này, ta hãy xuất phát từ phương trình Einstein về độ nhớt.

Phương trình Einstein – Các phân tử hình cầu

Xét các phân tử hình cầu, rắn tan trong dung môi. Dòng chảy qua các phân tử hình cầu sẽ bị biến dạng khi chảy qua bề mặt và làm quay các hình cầu này (phân tử). Chính sự biến dạng dòng chảy và sự quay của các phân tử sẽ

làm tiêu tốn năng lượng của dòng chảy, làm cho sự cản trở dòng chảy tăng lên so với dung môi tinh khiết, tức là làm tăng độ nhớt. Năm 1906, Einstein đã xây dựng phương trình quan hệ giữa độ nhớt dung dịch và dung môi trên giả thuyết là các phân tử có hình cầu và giữa chúng không có quan hệ với nhau (tức là rất loãng):

$$\eta_s = \eta_0 (1 + 2,5\Phi) \qquad (2.34)$$

Trong đó η_s là độ nhớt dung dịch, η_0 là độ nhớt dung môi, Φ là thành phần thể tích của các hạt cầu.

Phương trình Einstein-Simha – Các phân tử không đối xứng

Đối với các phân tử không đối xứng, sự biến dạng dòng chảy và sự quay của các phân tử sẽ làm tiêu tốn nhiều năng lượng hơn. Simha đã bổ sung vào phương trình Einstein các phân tử có hình dạng từ ellipsoid cho đến thanh rắn. Phương trình khi đó có dạng:

$$\eta_s = \eta_0 (1 + \nu\Phi) \qquad (2.35)$$

Phương trình đó được gọi là phương trình Einstein-Simha. ν là thông số hình dạng phụ thuộc vào tính không đối xứng của phân tử, gọi là nhân tố độ nhớt (viscosity factor).

Nếu gọi a là trục dài, b là trục ngắn của hình ellipsoid, với a/b > 10, thì

$$\nu = \frac{(a/b)^2}{15\left(\ln\frac{2a}{b} - \frac{3}{2}\right)} + \frac{(a/b)^2}{5\left(\ln\frac{2a}{b} - \frac{1}{2}\right)} + \frac{14}{15}$$

Theo quan hệ đó hệ số ν sẽ bằng 2,5 đối với hình cầu, khi a/b rất lớn, nó tỉ lệ với tỉ số a/b theo số mũ 1,8:

$$\nu \propto \left(\frac{a}{b}\right)^{1.8}$$

Quay lại công thức tính độ nhớt tương đối ta có:

$$\eta_r = \frac{\eta_s}{\eta_0} = 1 + \nu\Phi$$

Độ nhớt riêng: $\eta_{sp} = \eta_r - 1 = \nu\Phi$

Vì phương trình Einstein-Simha chỉ đúng trong trường hợp dung dịch vô cùng loãng, ta có thể viết phương trình trên ở một nồng độ xác định dưới dạng chuỗi:

$$\eta_{sp} = \nu\Phi + \kappa\Phi^2 + \zeta\Phi^3 + ...$$

Việc dùng thành phần thể tích ít có ý nghĩa thực tế, do đó ta chuyển qua thể tích động lực học riêng v_h và nồng độ khối lượng c như sau:

$$\Phi = v_h.c$$

Khi đó độ nhớt riêng có dạng: $\eta_{sp} = \nu v_h c + \kappa v_h^2 c^2 + ...$

Hay: $\frac{\eta_{sp}}{c} = \nu v_h + \kappa v_h^2 c + ...$

Theo định nghĩa độ nhớt nội: $[\eta] = \lim_{c\to 0}\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right) = \nu v_h$

Như vậy độ nhớt nội phụ thuộc vào nhân tố độ nhớt và thể tích động lực học riêng. Để thu được độ nhớt nội, người ta dựng đồ thị giữa η_{sp}/c với c, sau đó ngoại suy với c = 0, tức là tại điểm các trục tung. Thay độ nhớt nội vào phương trình trên, ta thu được phương trình Huggin:

$$\eta_{sp} = [\eta].c + \kappa[\eta]^2.c^2 \qquad (2.36)$$

Trong đó k là hằng số Huggin. Độ lớn của k nói lên sự tương tác giữa các phân tử, tức là sự tụ tập phân tử (aggregation). Ở nồng độ cao, đường biểu diễn quan hệ η_{sp}/c theo c không còn tuyến tính. Khi đó đồ thị semi-logarit có dạng đường thẳng và dùng phép ngoại suy để tinh độ nhớt nội:

$$\log\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right) = \log[\eta] + A\log[\eta].c \qquad (2.37)$$

Đây chính là phương trình Hermann với A là hằng số chưa tìm ra ý nghĩa lí thuyết.

Trong thực hành, hai đường thẳng biểu diễn quan hệ của η_{sp}/c và $\ln\eta_r/c$ tiến đến cùng giới hạn khi $c \to 0$. Trước đây đơn vị của độ nhớt nội là dl/g, nay thường dùng ml/g.

Để xác nhận lí thuyết về cấu hình của polymer với độ nhớt của dung dịch, ta hãy xem xét bảng các giá trị cho thấy quan hệ giữa khối lượng phân tử và độ nhớt nội của một số polymer, trong đó phân tử glucose được đưa vào để đối chiếu

Bảng 2.4 Khối lượng phân tử trung bình và độ nhớt nội của một số chất

Chất tan	Khối lượng phân tử trung bình, $\overline{M}w$, Dalton	Độ nhớt nội $[\eta]$, ml/g
Glucose	176	3,8
Ribonuclease	13 683	3,3
Serum albumin	67 500	3,7
Hemoglobin	68 000	3,6
Catalase	250 000	3,9
Fibrinogen	330 000	27
Myosin	440 000	217
Vi rút khảm thuốc lá	39 000 000	36,7
Alginate	300 000	700
Alginate	3 000 000	5000

Khi tính toán lí thuyết cho các phân tử protein hình cầu với nhân tố độ nhớt $\nu = 2,5$ ta thu được kết quả độ nhớt nội $[\eta] = 2,5 ml/g$. Kết quả ở bảng trên cho thấy các protein cầu có hệ số giữa hai trục a/b là từ 2-3 với độ nhớt nội từ 3-4 ml/g. Giá trị độ nhớt nội của phân tử glucose cho ta thấy kích thước của hình cầu không ảnh hưởng đến độ nhớt nội theo như phương trình Einstein.

Phương trình Mark-Houwink-Sakurada (MHS), quan hệ giữa độ nhớt nội và khối lượng phân tử

Độ nhớt của dung dịch polymer phụ thuộc vào khối lượng phân tử theo phương trình:

$$[\eta] = K.M^a \qquad (2.38)$$

Trong đó K và a là hai hệ số thực nghiệm, phụ thuộc vào loại polymer, loại dung môi và nhiệt độ. M là khối lượng phân tử trung bình.

Phương trình này có tầm quan trọng đặc biệt khi nghiên cứu về polymer. Nó cho phép thu được nhiều thông tin về khối lượng phân tử trung bình. về cấu hình polymer và tương tác giữa polymer với dung môi hoà tan.

Để xây dựng phương trình này cho một loại polymer nào đó, người ta tạo ra một dãy các polymer với khối lượng phân tử khác nhau, đo độ nhớt nội của chúng, xác định khối lượng phân tử bằng phương pháp thẩm thấu hay tán xạ ánh sáng (light scattering), sau đó dựng đồ thị giữa $\log[\eta]$ và logM, ta thu được các giá trị của K và a. Việc xác định K và a là công việc quan trọng khi nghiên cứu về các polymer vì hai lí do:

Khi đã biết K và a, chỉ cần đo độ nhớt nội, ta có thể biết khối lượng phân tử mà việc đo độ nhớt thì đơn giản.

Hệ số K và a cho biết thông tin về cấu hình polymer.

Đối với polymer hình cầu phương trình MSH có dạng: $[\eta] = 2,5M^0$

Đối với dạng thanh cứng: $[\eta] = K.M^{1.8}$

Đối với dạng phân tử mềm dẻo: $[\eta] = K.M^{0.5-0.8}$

Trong đó a = 0,5 đối với dung môi theta, a=0,8 đối với dung môi hoà tan tốt.

Các polymer đa điện li (polyelectrolites), thông số B

Đối với các phân tử dạng cầu hay dạng thanh cứng, các điện tích trên bề mặt ảnh hưởng ít đến độ nhớt. Nhưng đối với các polymer đa điện li dạng mềm dẻo, các điện tích cùng dấu (như nhóm carboxyl trong alginat) làm cho phân tử giãn ra rất nhiều so với dạng trung hoà. Đó là do lực đẩy tĩnh điện giữa các điện tích. Sự giãn này càng lớn khi nồng độ muối càng thấp. Vì rằng độ nhớt nội tỉ lệ bậc ba với bán kính hồi chuyển (radius of gyration) sự giãn mạch của polymer có ảnh hưởng rất lớn đến độ nhớt.

Do ảnh hưởng lớn của nồng độ muối, ta cần phải đo độ nhớt nội tại cường độ ion không đổi. Khi trích dẫn độ nhớt nội, ta cần phải ghi chú độ pH và cường độ ion. Tuy vậy cường độ ion không hoàn toàn xác định cấu hình: các ion trái dấu đa hoá trị làm giảm độ nhớt nhiều hơn là các ion cùng dấu đa hoá trị, đặc biệt các ion trái dấu như Ca^{++} tác dụng lên alginat hay K^+ đối với carrageenan có thể tạo gel.

Khi hoà tan các polymer đa điện li trong nước, các ion trái dấu sẽ phân li để tạo thành một nồng độ nào đó trong dung dịch. Nồng độ này là tỉ lệ với nồng độ polymer thêm vào. Khi ta pha loãng dung dịch để xác định độ nhớt nội, nồng độ ion này sẽ giảm đi và khả năng chắn lực đẩy tĩnh điện sẽ giảm đi. Nếu polymer được hoà tan trong nước tinh khiết, phân tử sẽ giãn ra khi pha loãng. Điều này sẽ làm tăng độ nhớt η_{sp}/c khi giảm nồng độ polymer. Hiện tượng này gọi là hiệu ứng nhớt điện (electro-viscous effect). Nồng độ ion ảnh hưởng đến độ nhớt nội của polymer có phân tử lượng cao nhiều hơn là phân tử lượng thấp. Khoảng cách giữa các điện tích trên mạch phân tử cũng là nhân tố quan trọng. Như vậy độ rắn của mạch phân tử là một thông số quan trọng đến sự co hay giãn mạch phân tử đa điện li tương ứng với sự thay đổi cường độ ion.

Từ dữ liệu thực nghiệm, ta có quan hệ sau giữa độ nhớt nội và cường độ ion I:

$$[\eta] = [\eta]_\infty + S.\frac{1}{\sqrt{I}},$$

Với $[\eta]_\infty$ là độ nhớt nội tại cường độ ion vô hạn. S là "độ chịu muối" của polymer.

$$S = B.\left([\eta]_{0.1}\right)^{v} \text{ với } I = 0,1M$$

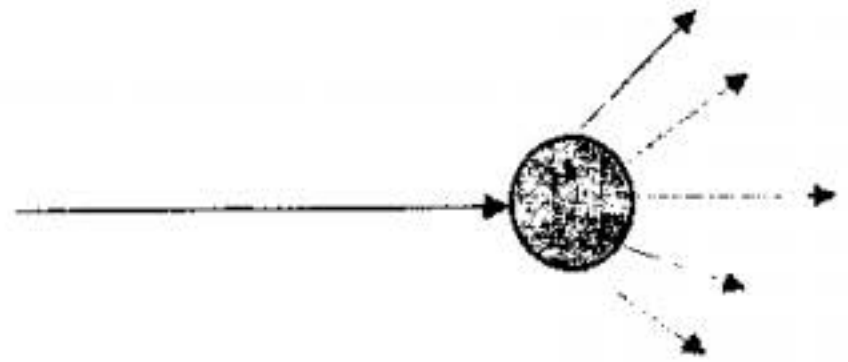
Biến đổi qua dạng logarit, ta có:

$$\log S = v.\log\left([\eta]_{0.1}\right) + \log B \qquad (2.39)$$

Thông số B được xem như một đại lượng đo lường khả năng co lại hay giãn ra của một polymer đáp ứng với sự thay đổi cường độ ion, nói cách khác nó là "độ rắn của polymer". Hệ số tỉ lệ *v* được tìm thấy khoảng 1,3 cho nhiều loại polymer đa điện li khác nhau. Do đó:

$$B = \frac{S}{\left([\eta]_{0.1}\right)^{1.3}} \qquad (2.40)$$

Nghiên cứu polymer bằng phương pháp tán xạ ánh sáng (light scattering)



Hình 2.5 Tán xạ ánh sáng trên một hạt

Khi ánh sáng đi đến một hạt nó sẽ tán xạ theo mọi hướng. Cường độ ánh sáng tán xạ phụ thuộc vào độ phân cực mà độ phân cực phụ thuộc vào khối lượng phân tử. Do đó tán xạ ánh sáng là một công cụ hữu ích để nghiên cứu khối lượng phân tử polymer.

Khác với phương pháp áp suất thẩm thấu phụ thuộc vào số lượng hạt và do đó cho biết khối lượng phân tử trung bình số, tán xạ ánh sáng phụ thuộc vào khối lượng phân tử trung bình khối. Tán xạ ánh sáng còn phụ thuộc trực tiếp vào kích thước hạt. Đối với dung dịch polymer, sự phụ thuộc đó cho phép đo bán kính hồi chuyển của phân tử. Ngoài ra phương pháp này còn cho phép đo hệ số virial thứ hai.

Lí thuyết tán xạ ánh sáng do Lord Rayleigh xây dựng và áp dụng cho các hạt nhỏ với kích thước hạt nhỏ hơn 20 lần bước sóng ánh sáng. Vì sóng ánh

sáng nằm trong khoảng từ 4000Å đến 8000Å bán kính hồi chuyển trung bình của hạt nhỏ hơn khoảng 200Å đến 400Å.

Ánh sáng là sóng điện từ mô tả bởi phương trình:

$$E = E_0 \cos\left(\frac{2\pi \bar{c} t}{\lambda}\right) \qquad (2.41)$$

Với E_0 biên độ của trường điện, $\bar{c}$ là tốc độ ánh sáng, λ là bước sóng ánh sáng. Ánh sáng sẽ làm cho hạt bị phân cực cảm ứng với mômen lưỡng cực tính theo công thức:

$$p = \alpha_p E_0 \cos\left(\frac{2\pi \bar{c} t}{\lambda}\right) \qquad (2.42)$$

Với α_p là độ phân cực của hạt. Độ phân cực càng lớn thì mômen lưỡng cực cảm ứng càng lớn.

Chính sự dao động của lưỡng cực đã bức xạ ánh sáng theo mọi hướng, tức là tán xạ.

Cường độ ánh sáng tán xạ theo góc θ với phương ánh sáng tới được tính theo công thức:

$$i_\theta^0 = \frac{I_0 nN}{V} \frac{8\pi^4 \alpha_p^2}{r^2 \lambda^4} (1 + \cos^2 \theta) \qquad (2.43)$$

Với n là số mol, N là số Avogadro, V là thể tích dung dịch loãng, λ là bước sóng, I_0 là cường độ ánh sáng tới, r là khoảng cách từ hạt.

Theo công thức trên, cường độ ánh sáng tán xạ phụ thuộc vào nhiều nhân tố. Do phụ thuộc vào góc tán xạ θ với số hạng $\cos^2 \theta$ nên cường độ tán xạ theo hai chiều ngược nhau là như nhau (góc θ và góc $180^0 - \theta$). Cường độ ánh sáng tán xạ tỉ lệ nghịch với λ^4 nên khi sóng dài thì tán xạ kém hơn sóng ngắn rất nhiều.

Dung dịch lí tưởng

Xét dung dịch polymer lí tưởng ta có hệ số phân cực phụ thuộc vào sự chênh lệch chỉ số khúc xạ giữa dung môi và polymer. Độ phân cực của polymer ở nồng độ c là:

$$\alpha_p = \frac{n_0 cV}{2\pi nN} \frac{dn_0}{dc} \qquad (2.44)$$

Trong đó n_0 là chỉ số khúc xạ. Chú ý là nếu chỉ số khúc xạ của dung môi và polymer là như nhau thì $dn_0/dc = 0$ và không có phân cực và do đó cũng không có tán xạ.

Thay $c = nM / V$ vào công thức trên ta có:

$$\alpha_p = \frac{n_0 M}{2\pi N}\frac{dn_0}{dc} \qquad (2.45)$$

Từ đó suy ra:

$$i_\theta^0 = \frac{I_0 nN}{V}\frac{8\pi^4\alpha_p^2}{r^2\lambda^4}(1+\cos^2\theta) = \frac{I_0 2\pi^2}{r^2\lambda^4}\frac{n_0}{N}\left(\frac{dn_0}{dc}\right)^2 Mc(1+\cos^2\theta) \qquad (2.46)$$

Tỉ số giữa cường độ ánh sáng tán xạ và ánh sáng tới là:

$$\frac{i_\theta^0}{I_0} = \frac{2\pi^2}{r^2\lambda^4}\frac{n_0}{N}\left(\frac{dn_0}{dc}\right)^2 Mc(1+\cos^2\theta) \qquad (2.47)$$

Đặt $R_\theta^0 = \frac{r^2 i_\theta^0}{I_0}$: gọi là tỉ số Rayleigh

Và $K = \frac{2\pi^2}{r^2\lambda^4}\frac{n_0}{N}\left(\frac{dn_0}{dc}\right)^2(1+\cos^2\theta)$

Ta có phương trình đơn giản: $R_\theta^0 = KMc$ (2.48)

Đối với dung dịch polymer đa phân tán, ta có thể viết phương trình trên ở dạng:

$$R_\theta^0 = K\sum_i c_i M_i \qquad (2.49)$$

Hay $$\frac{Kc}{R_\theta^0} = \frac{\sum_i c_i}{\sum_i c_i M_i} = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i M_i^2} = \frac{1}{\overline{M}_w} \qquad (2.50)$$

Như vậy ta thu được quan hệ trực tiếp giữa tỉ số Rayleigh và khối lượng phân tử trung bình theo khối lượng.

Dung dịch polymer không lí tưởng (thực)

Đối với dung dịch thực ta có thể dùng phép giãn virial (virial expansion) bằng cách thêm các hệ số virial và nồng độ:

$$\frac{Kc}{R_\theta^0} = \frac{1}{\overline{M}w} + 2A_2c + 3A_3c^2 + \ldots$$

Các hệ số virial tương tự như trong phần áp suất thẩm thấu. Khi nồng độ nhỏ ta có thể bỏ qua số hạng bình phương của nồng độ và từ số liệu thực nghiệm dựng đường thẳng giữa $\frac{Kc}{R_\theta^0}$ với nồng c, ta có thể thu được giá trị của khối lượng phân tử trung bình $\overline{M}w$ và hệ số A_2 (đường thẳng cắt trục tung tại $1/\overline{M}w$, độ dốc là $2A_2$).

Hạt có kích thước lớn

Khi hạt có kích thước lớn, ánh sáng tán xạ từ các phần khác nhau của hạt sẽ đến detector với khoảng cách khác nhau và do đó sẽ làm suy giảm lẫn nhau do lệch pha.

Độ giảm cường độ tán xạ do hạt lớn thay đổi theo góc tán xạ, độ giảm bằng không ở góc $\theta = 0^0$ và độ giảm lớn nhất ở góc $\theta = 180^0$. Để tính toán cho hạt lớn, cần đưa ra một đại lượng mới là tỉ số giữa cường độ tán xạ của hạt lớn và hạt bé:

$$P(\theta) = \frac{i_\theta}{i_\theta^0} = \frac{R_\theta}{R_\theta^0}$$

Suy ra $R_\theta = P(\theta)R_\theta^0$

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{Kc}{P(\theta).R_\theta^0} = \frac{1}{\overline{M}w.P(\theta)} \qquad (2.51)$$

Theo lí thuyết, người ta tính được hàm $P(\theta)$ là:

$$\frac{1}{P(\theta)} = 1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2}\left\langle R_G^2 \right\rangle \sin^2\frac{\theta}{2} + \ldots$$

Từ đó: $$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{\overline{M}w}\left(1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2}\left\langle R_G^2 \right\rangle \sin^2\frac{\theta}{2}\right) \qquad (2.52)$$

Để giải quyết đồng thời hạt có kích thước lớn và dung dịch không lí tưởng, ta dùng phép biến đổi theo các hệ số virial:

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{Kc}{P(\theta).R_\theta^0} = \left(\frac{1}{\overline{M}w} + 2A_2c + \ldots\right)\frac{1}{P(\theta)}$$

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \left(\frac{1}{\overline{M}w} + 2A_2c + \ldots\right)\left(1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2}\left\langle R_G^2 \right\rangle \sin^2\frac{\theta}{2}\right) \qquad (2.53)$$

Để thu được các đại lượng cần thiết một cách thuận tiện nhất sau khi đã có số liệu thực nghiệm, Zimm đã đề xuất cách xây dựng đồ thị như sau (gọi là đồ thị Zimm):

Bảng 2.5 Dữ liệu thực nghiệm tán xạ ánh sáng

	c_1	c_2	....	c_n
θ_1	$(Kc/R_\theta)_{1,1}$	$(Kc/R_\theta)_{2,1}$	...	$(Kc/R_\theta)_{n,1}$
θ_2	$(Kc/R_\theta)_{1,2}$	$(Kc/R_\theta)_{2,2}$	...	$(Kc/R_\theta)_{n,2}$
...	....	...	...	...
θ_m	$(Kc/R_\theta)_{1,m}$	$(Kc/R_\theta)_{2,m}$	...	$(Kc/R_\theta)_{n,m}$

Dựng các đường thẳng giữa Kc/R_θ với $\left(\sin^2(\theta/2)+kc\right)$ với k chọn tuỳ ý để tiện vẽ đồ thị. Ta sẽ được các đường cắt nhau như lưới như hình dưới. Để thu được các giá trị ta phải làm hai phép ngoại suy: khi $\theta = 0$ và $c = 0$. Các đường với $\theta = 0$ và $c = 0$ sẽ cắt trục tung với cùng giá trị $1/\overline{M}w$. Độ dốc của đường $\theta = 0$ bằng $2A_2/K$, độ dốc của đường $c = 0$ bằng $\frac{1}{\overline{M}w}\frac{16\pi^2}{3\lambda^2}R_G^2$.

Từ đó ta tính được ba giá trị cơ bản của polymer là $\overline{M}w$, A_2 và R_G.

d) Mạng lưới liên kết và sự tạo gel của polymer sinh học

Trong dung dịch có nồng độ lớn hơn một giá trị xác định c^* (critical overlap concentration), với $c^* \approx 2,5/[\eta]$ hay polymer tan chảy, các mạch polymer có thể liên kết với nhau tạo thành một mạng lưới liên tục. Mạng lưới này trở thành một phân tử khổng lồ. Nếu mạng lưới này chứa các phân tử của dung môi, ví dụ như nước, thì ta có một gel. Có rất nhiều định nghĩa khác nhau về gel. Mỗi định nghĩa bộc lộ một khía cạnh khác nhau. Các phân tử liên kết với nhau theo từng vùng trên mạch phân tử và phần còn lại thì không liên kết, tương tự như các sợi đan vào nhau trên một tấm lưới để tạo thành các mắt lưới. Vì cả khối gel là một mạng lưới nên khi cung cấp năng lượng, năng lượng đó sẽ được giữ hoặc giải phóng ra trên cả mạng lưới. Theo cách lí luận đó, khối gel có tính chất như một vật rắn hơn là một dung dịch mặc

dù trên 95% khối lượng của gel là dung môi. Tính chất của khối rắn này phụ thuộc vào các liên kết.

Nếu các liên kết này yếu, khi tác dụng một lực đủ mạnh, nó sẽ chảy như một dung dịch. Khi lực này không còn, nó sẽ khôi phục các liên kết yếu để hình thành khối gel. Gel như thể gọi là động thái dẻo Bingham theo phân loại của ngành lưu biến học.

Trong tự nhiên các gel như thế rất quan trọng vì nó giữ nước trong rất nhiều cơ thể sinh vật. Ví dụ như gel alginat trong rong biển và gel hyaluronic trong cầu mắt.

Trong nghiên cứu, gel dùng trong sinh hoá, sinh học và y học như điện di và sắc kí. Gel còn dùng trong kĩ thuật mô, nuôi cấy cơ quan nhân tạo. Gel còn dùng trong nuôi cấy vi sinh vật, nuôi cấy tế bào, dùng trong mĩ phẩm và thực phẩm. Gel agar, alginat, gelatin có ứng dụng rất rộng.

CHƯƠNG 3

CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU POLYMER SINH HỌC

1. Phương pháp đo độ nhớt

Độ nhớt động lực hay hệ số độ nhớt η, về mặt ý nghĩa là lực tiếp tuyến trên một đơn vị diện tích bề mặt, còn gọi là ứng suất tiếp τ, biểu diễn bằng pascal, cần thiết để làm chuyển động song song với một mặt phẳng trượt một lớp chất lỏng có diện tích 1 m^2 với tốc độ υ là 1 m/s đối với một lớp chất lỏng song song cách 1m. Tỉ số $dv/dx = \dot{\gamma}$ gọi là tốc độ trượt và có thứ nguyên là 1/s. Theo phương trình Newton ta có:

$$\eta = \tau / \dot{\gamma} \qquad (3.1)$$

Đơn vị đo độ nhớt là Pa.s. Đối với các dung dịch polymer thường đo bằng mPa.s.

Độ nhớt động học bằng tỉ số giữa độ nhớt động lực và khối lượng riêng và có thứ nguyên là mm^2/s.

Nhớt kế mao quản thường dùng để đo độ nhớt của chất lỏng Newton còn nhớt kế quay dùng đo độ nhớt chất lỏng Newton và phi Newton.

$$\upsilon = \eta/\rho \qquad (3.2)$$

Phương pháp đo bằng nhớt kế mao quản:

Nếu không có yêu cầu đặc biệt, nhiệt độ dùng đo độ nhớt thường chọn là $20 \pm 0,1^0C$. Độ chính xác của thời gian là 1/5 giây. Giá trị đo hai lần liên tiếp không được lệch quá 1%. Giá trị trung bình không được tính dưới ba lần đo.

Độ nhớt động lực tính theo công thức:

$$\eta = k\rho t \qquad (3.3)$$

Với k là hằng số của nhớt kế, thứ nguyên là mm^2/s^2 được xác định khi chuẩn độ nhớt kế.

ρ là mật độ chất lỏng, mg/mm^3, thu được bằng cách lấy tỉ trọng nhân cho 0,9982.

t là thời gian chảy của chất lỏng, tính bằng s.

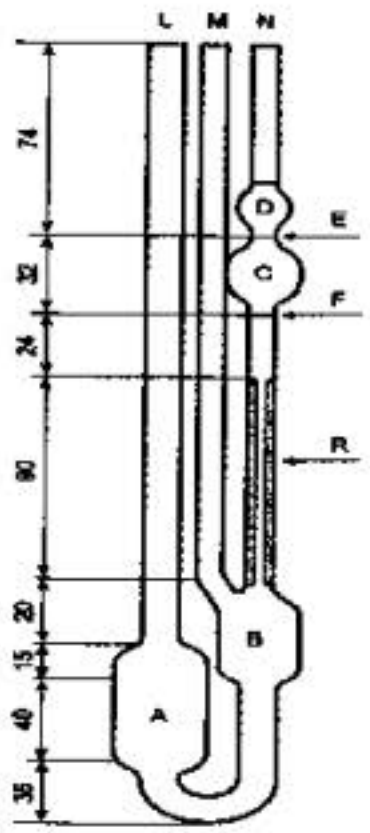
Độ nhớt động học tính theo công thức:

$$\upsilon = kt \qquad (3.4)$$

Nhớt kế mao quản có nhiều loại khác nhau về hình dạng và kích thước. Dưới đây là một số loại nhớt kế mao quản với các thông số.

Bảng 3.1. Thông số của các cỡ nhớt kế mao quản

Số cỡ	Hằng số của nhớt kế	Khoảng độ nhớt động học	Đường kính trong của ống mao quản R	Thể tích bầu chứa
	$mm^2.s^{-2}$	mm^2s^{-1}	mm (±2%)	ml(±5%)
1	0,01	3,5-10	0,64	5,6
1A	0.03	6-30	0,84	5,6
2	0.1	20-100	1,15	5,6
2A	0.3	60-300	1,51	5,6
3	1.0	200-1000	2,06	5,6
3A	3.0	600-3000	2,74	5,6
4	10	2000-10 000	3,70	5,6
4A	30	6000-30 000	4,07	5,6
5	100	20 000-100 000	6,67	5,6



Khi nghiên cứu dung dịch polymer, người ta dùng nhớt kế mao quản để xác định khối lượng phân tử của dung dịch rất loãng. Do đó các thí nghiệm cần tiến hành ở điều kiện nghiêm ngặt.

Đối với nhớt kế rotor, khi nghiên cứu các chất lỏng phi newton, cần chọn rotor và tốc độ quay thích hợp và phải nêu rõ điều này bên cạnh giá trị độ nhớt vì độ nhớt phụ thuộc vào tốc độ trượt. Để xác định độ nhớt, có thể cho dung dịch vào dụng cụ đủ lớn so với rotor để tránh ảnh hưởng của thành cốc. Nhưng để xây dựng quan hệ ứng suất-biến dạng, cần có ống đựng dung dịch chính xác vì kích thước đó tham gia vào quá trình tính toán. Khi độ nhớt phụ thuộc vào thời gian, cần chú ý hệ thống ổn nhiệt phải đủ tốt để không làm tăng nhiệt độ của dung dịch trong quá trình đo lâu. Nhớt kế rotor dùng để đặc trưng các tính chất lưu biến của polymer sinh học.

2. Phổ hồng ngoại

Sóng điện từ được phân thành các vùng khác nhau, trong đó mắt người chỉ nhìn thấy trong vùng khả kiến. Bên ngoài vùng đó về phía sóng dài ta có vùng hồng ngoại. Vùng hồng ngoại dùng trong kĩ thuật phân tích không nằm kề cận vùng khả kiến mà là vùng có bước sóng từ 2500 đến 16000 nm. Khi chiếu tia hồng ngoại đến các phân tử, các liên kết của nó sẽ hấp thụ và kích thích các dao động của các liên kết hoá học. Mỗi loại liên kết hấp thu sóng hồng ngoại ở bước sóng khác nhau. Để thuận tiện, người ta biểu diễn các dải hồng ngoại bằng đại lượng số sóng trên một cm, thứ nguyên cm^{-1}.

Mỗi hợp chất hữu cơ sẽ có một phổ đặc trưng của nó bao gồm các dải hấp thu tương ứng với các liên kết khác nhau.

Về nguyên lí, nếu phân tử có n nguyên tử, sẽ có 3n bậc tự do, 6 bậc trong số đó thuộc về các chuyển động quay và tịnh tiến của phân tử. Số còn lại là bậc tự do của các dao động của các liên kết trong phân tử. Các liên kết không cứng như các mô hình thường minh hoạ mà nó có tính đàn hồi và có nhiều kiểu dao động khác nhau của các liên kết. Đó là các dao động co duỗi (stretching), uốn (bending), cắt kéo (scissoring), bập bênh (rocking) và xoắn (twisting). Có nhiều nhân tố ảnh hưởng đến tần số dao động của các liên kết.

Trong thực tế, không phải lúc nào phổ IR cũng thể hiện đủ 3n – 6 các dải hấp thu mà số tín hiệu có thể tăng lên do tương tác giữ các liên kết lân cận. Đối với polymer, các tương tác này càng phức tạp, đặc biệt khi nó ở cấu trúc rắn còn tương đối nguyên vẹn trong trường hợp của chitin. Trong các sổ tay, ta có thể tra cứu các tần số hấp thu của các liên kết trong các hợp chất khác nhau. Cần chú ý rằng cùng loại liên kết nhưng trong các phân tử khác nhau, tần số hấp thu sẽ khác nhau. Ví dụ cùng liên kết C=O nhưng trong các chất như acid carboxylic, anhydride, amid và ester sẽ khác nhau.

Trong các nghiên cứu về polymer sinh học ta chú ý đến các dải hấp thu tương ứng với các liên kết của các nhóm amin N-H, các nhóm O-H, C=O trong các polysaccharide.

Phổ hồng ngoại được dùng cho các mẫu ở trạng thái rắn, lỏng và khí. Đối với chất lỏng, mẫu được chuẩn bị ở dạng lớp mỏng giữa hai tấm phẳng bằng muối (NaCl trong suốt với sóng hồng ngoại). Khi hoà tan trong dung dịch, cần chú ý ảnh hưởng của dung môi có thể che khuất vùng phổ quan trọng. Các dung môi thường dùng là carbon tetrachloride, chloroform và tetrachloroethene. Đối với chất rắn, mẫu được chuẩn bị cùng với KBr và ép thành một đĩa nhỏ.

Trong nghiên cứu polymer sinh học, phổ hồng ngoại thường được dùng để xác định các nhóm chức, qua đó hiểu biết hơn về cấu trúc của chúng, phát hiện ra các nhóm bên đính vào các mạch chính của polymer.

3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân

Phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân, NMR (nuclear magnetic resonance spectroscopy) được phát triển lần đầu tiên năm 1946 bởi một nhóm các nhà nghiên cứu thuộc hai đại học Stanford và MIT của Mĩ. Trong hơn 50 năm qua đó là phương pháp hàng đầu giúp các nhà hoá học xác định chi tiết cấu trúc hoá học của các chất. Một thành tựu nổi tiếng của phương pháp này là phương pháp ảnh cộng hưởng từ MRI, (Magnetic Resonance Imager) dùng trong y học. Phương pháp NMR ngày nay đã vượt ra khỏi phòng thí nghiệm và áp dụng vào việc phân tích ngay trong quá trình sản xuất nhờ vào công nghệ sản xuất nam châm vĩnh cửu ổn định.

Phương pháp NMR dựa trên các tính chất từ của hạt nhân để cung cấp thông tin về cấu trúc hoá học. Về mặt cơ học lượng tử, các hạt dưới nguyên tử (proton, neutron và electron) có số lượng tử spin. Trong một số nguyên tử như ^{12}C, ^{16}O, ^{32}S, các spin đi thành cặp và loại trừ lẫn nhau, do đó số spin tổng cộng của nguyên tử bằng không. Tuy nhiên, trong một số các nguyên tử khác như ^{1}H, ^{13}C, ^{31}P, ^{15}N... các nguyên tử có số spin tổng khác không.

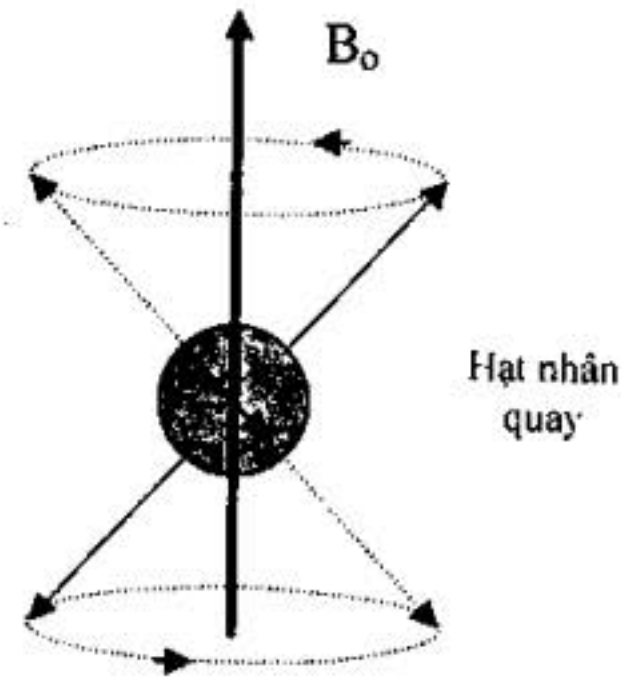
Số spin của hạt nhân có thể tính như sau: Nếu cả hai số neutron và proton đều là số chẵn, hạt nhân không có spin. Nếu số neutron cộng số proton là số lẻ, hạt nhân có số spin bằng một nửa các số nguyên lẻ, nghĩa là 1/2, 3/2, 5/2. Nếu số neutron và số proton đều lẻ, hạt nhân có số spin là các số nguyên 1, 2, 3.

Theo cơ học lượng tử, mômen từ hạt nhân sẽ định hướng theo từ trường ngoài B_0 theo 2I+1 cách, với I là số lượng tử spin. Trục quay của hạt nhân sẽ không định hướng chính xác theo phương từ trường nhưng có chuyển động tiến động (tương tự chuyển động của con quay) tạo một góc so với hướng từ trường và có vận tốc góc:

$$\omega_o = \gamma B_o \qquad (3.5)$$

Với ω_o là vận tốc góc của chuyển động tiến động còn được gọi là tần số Lamor, γ là tỉ số hồi chuyển, liên hệ giữa mômen từ và số spin như sau:

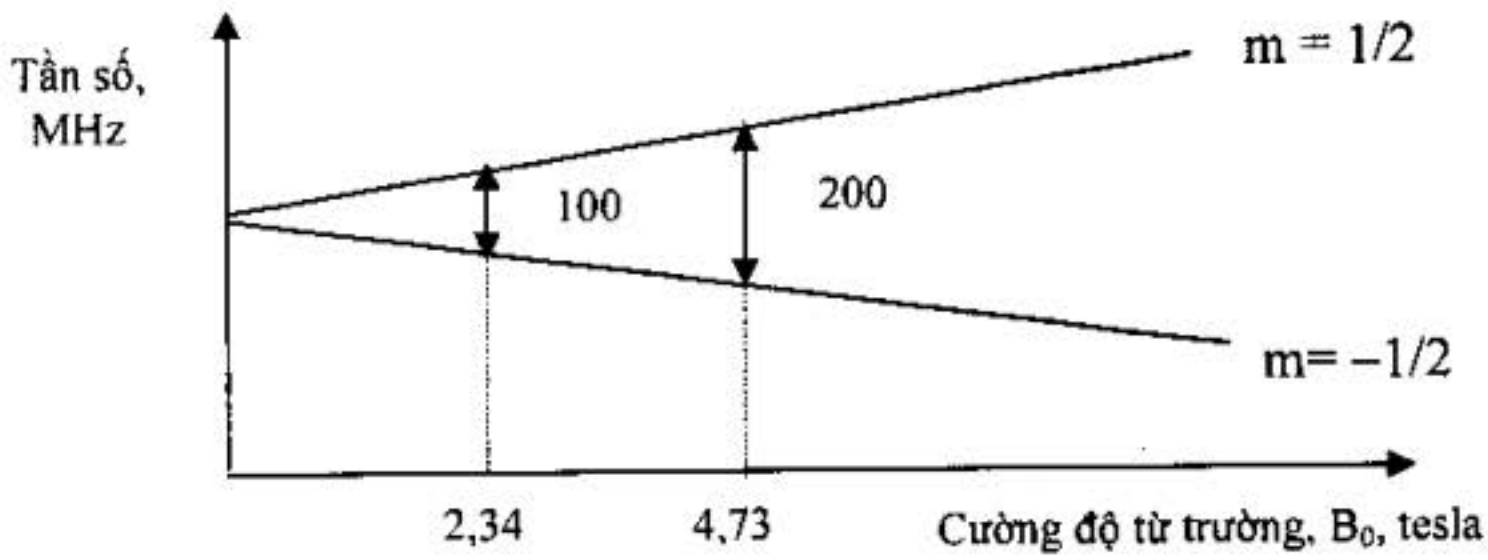
$$\gamma = 2\pi\mu/hI \qquad (3.6)$$



Hình 3.1 Chuyển động tiến động của hạt nhân dưới tác dụng của từ trường

Mỗi hạt nhân có một giá trị γ đặc trưng. Chuyển động tiến động sinh ra một điện trường với tần số ω_0. Nếu ta chiếu mẫu bằng sóng radio cùng tần số (dải sóng MHz), proton sẽ hấp thụ năng lượng để lên mức năng lượng cao

hơn. Hiện tượng này gọi là cộng hưởng vì tần số của bức xạ điện từ và chuyển động tiến động bằng nhau.



Hình 3.2 Sự tách trạng thái spin hạt nhân dưới tác dụng của từ trường

Sự định hướng của mômen từ hạt nhân trước tác động của từ trường ngoài không bằng nhau về năng lượng. Trạng thái spin định hướng song song với trường ngoài ở mức năng lượng thấp hơn là khi không có trường ngoài. Ngược lại, trạng thái spin định hướng ngược với trường ngoài có mức năng lượng cao hơn là khi không có trường ngoài.

Khi có một sai biệt giữa các mức năng lượng, có một xác suất chuyển giữa các trạng thái spin. Bằng cách chiếu xạ hạt nhân với tần số phù hợp, hạt nhân ở mức năng lượng thấp có thể chuyển lên mức năng lượng cao.

Đối với hạt nhân có hoạt tính NMR, chúng sẽ phân bố ở các trạng thái spin khác nhau. Sự khác biệt giữa số lượng các hạt nhân ở hai mức năng lượng khác nhau được tính theo công thức phân bố của Boltzman, gọi là tỉ số tổng thể:

$$N_{upper} / N_{lower} = e^{-\gamma B_0 / kT} \qquad (3.7)$$

Khi áp dụng cho proton với từ trường 1,41 Tesla, tỉ số tổng thể là 0,9999382, tức là sai khác nhau một con số rất nhỏ. Do đó phương pháp này đòi hỏi độ chính xác rất cao và lượng mẫu phải đủ lớn.

Hiện nay người ta sử dụng phổ biến thiết bị NMR dùng phép biến đổi Fourrier. Theo phương pháp này, người ta cộng các phổ thu được lại với nhau, các nhiễu xuất hiện ngẫu nhiên sẽ loại trừ trong khi tín hiệu sẽ được tăng lên rất nhiều lần. Khi bị kích thích bằng sóng điện từ dưới dạng xung, hạt nhân sẽ chuyển lên mức năng lượng không bền, sau đó khi tắt xung, hạt nhân sẽ quay về trạng thái cân bằng được gọi là sự hồi phục (relaxation), khi đó nó sẽ phát ra một tín hiệu suy giảm (free induction decay, FID) và được một thiết bị thu lại.

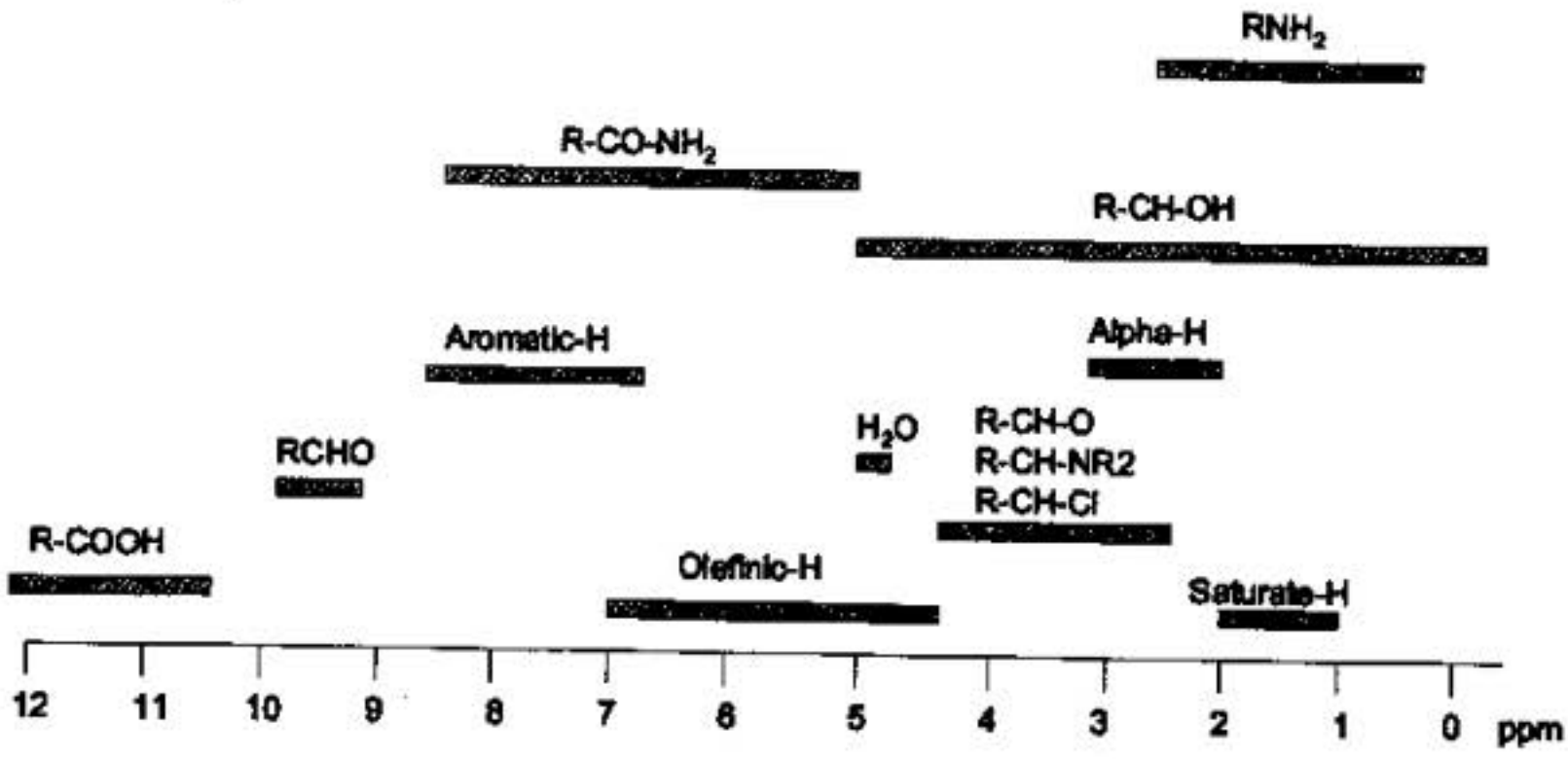
Dưới tác dụng của một từ trường mạnh như nói trên, các vectơ spin sẽ phân bố lệch một góc với từ trường, nhưng tổng các vectơ đó tạo thành vectơ M nằm cùng chiều với B_0. Người ta tác dụng một xung có tần số radio làm cho vectơ M bật xuống vuông góc với B_0. Sau đó, khi tắt xung, vectơ M sẽ có chuyển động tiến động quay về giá trị ban đầu và hạt nhân phát ra một tín hiệu suy giảm FID. Trong tín hiệu đó chứa các thông tin của tất cả các hạt nhân nghiên cứu.

Nhưng nếu như vậy thì ta vẫn chưa hiểu được liên kết giữa các nguyên tử. Vấn đề là chung quanh nguyên tử luôn có các electron và khi chuyển động chúng tạo ra một từ trường. Chính từ trường này làm giảm tác động của từ trường ngoài lên hạt nhân, do đó cần phải tăng từ trường lên để thắng được hiệu ứng chắn này của electron. Tần số Lamor khi đó tính theo biểu thức:

$$\omega_0 = \gamma(B_0 - S) \qquad (3.8)$$

Với S là mô men từ tạo nên bởi các electron.

Trong kĩ thuật NMR, cần phải chọn một chất làm chuẩn. Đó là chất tetramethylsilane, TMS, gồm có bốn nhóm CH_3 liên kết với một nguyên tử silicon. Vì các proton của các nhóm methyl có môi trường electron như nhau nên ta chỉ thu được một tín hiệu duy nhất. Vì độ âm điện của nguyên tử carbon lớn hơn silicon nên các electron lệch về các nguyên tử carbon nhiều hơn. Do đó tín hiệu nằm ở vùng trường rất mạnh. Các tín hiệu khác khi so sánh với tín hiệu chuẩn tạo nên độ dịch chuyển hoá học (chemical shift), tính bằng ppm.



Hình 3.3 Độ dịch chuyển hoá học của một số nhóm chức chung trên phổ NMR proton

Khi nghiên cứu về các polymer sinh học, ta cần chú ý tạo độ nhớt thấp cho dung dịch để các phân tử đủ linh động. Các polysaccahride như alginat hay carrageenan có khả năng tạo gel với các ion kim loại. Do đó khi chuẩn bị mẫu, người ta thường cho thêm EDTA để bắt giữ các ion, nâng nhiệt độ chạy mẫu để giảm độ nhớt của dung dịch. Trong một số trường hợp, việc tăng nhiệt độ còn làm dịch chuyển mũi HOD của dung môi (trong trường hợp hoà tan vào nước nặng D_2O) để lộ ra các mũi cần nghiên cứu như trường hợp của alginat. Các polymer có DP quá lớn cũng cần thuỷ phân đến một mức độ nhất định. Để thu các thông tin cuối cùng về cấu trúc polymer, cần phát triển các công thức toán liên quan mà đôi khi khá cồng kềnh. Do đó, phương pháp này đòi hỏi trình độ lí thuyết cao khi nghiên cứu cấu trúc các hợp chất phức tạp.

Dưới tác dụng của các liên kết lân cận các mũi cộng hưởng sẽ bị tách ra (split) và do đó cho ta thêm các thông tin về cấu trúc phân tử. Thiết bị NMR càng nhạy, càng tách thành nhiều mũi.

Trên nền tảng của lí thuyết NMR, các kĩ thuật phân tích ngày càng phát triển và đóng vai trò không thể thiếu trong việc nghiên cứu cấu trúc.

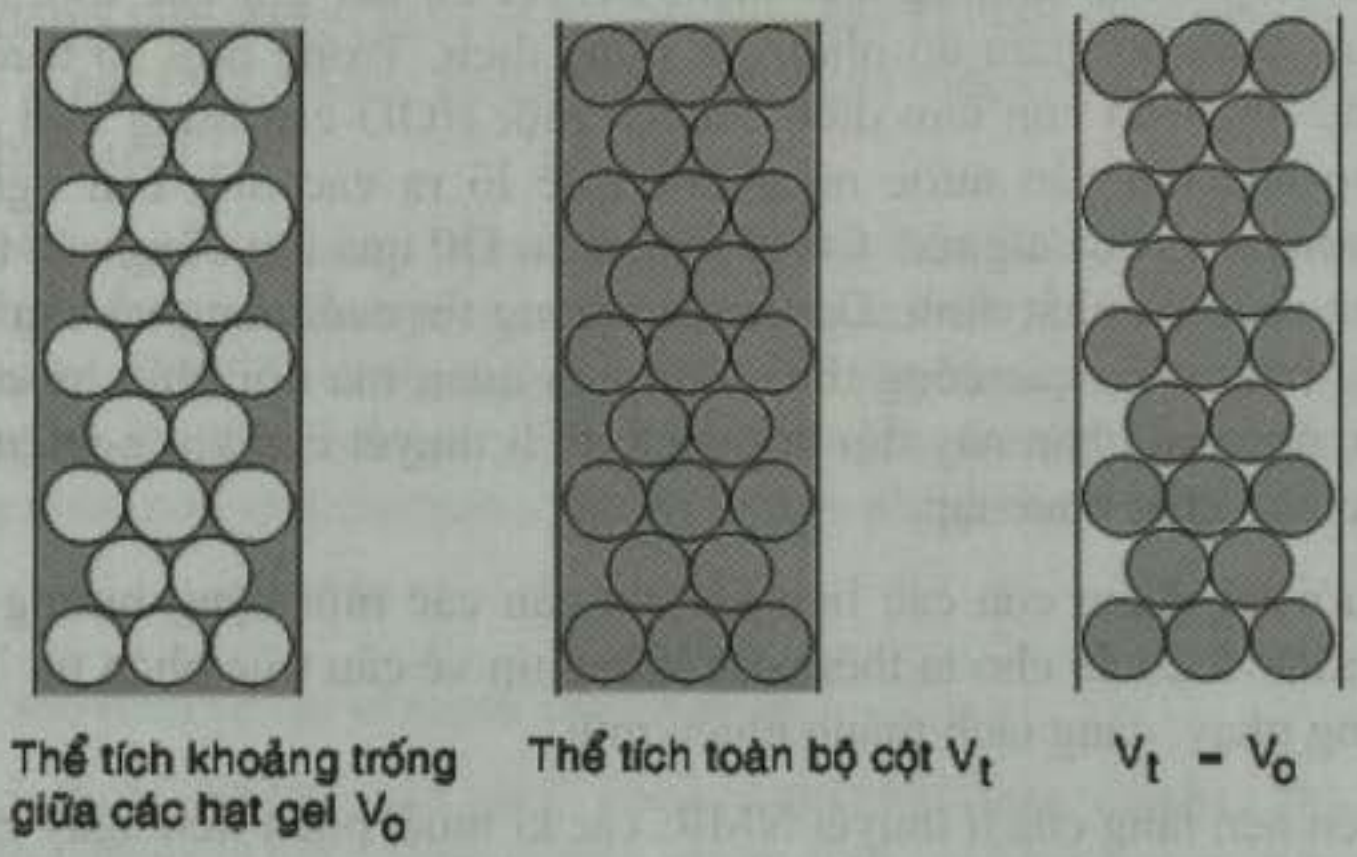
4. Sắc kí

Để thu được các phân tử sinh học tinh khiết từ một hỗn hợp với nhiều chất khác nhau về khối lượng phân tử và nồng độ, người ta dùng các kĩ thuật phân riêng khác nhau, trong đó phương pháp sắc kí được ứng dụng rất rộng rãi. Nguyên lí chung của phương pháp sắc kí là phân riêng các chất trong một hỗn hợp do sự tương tác giữa các chất tan trong pha động khi nó di chuyển ngang qua một pha rắn. Mỗi phương pháp sắc kí dựa trên một tính chất khác nhau. Sắc kí ion dựa trên bản chất ion của chất tan và chất trao đổi ion, sắc kí ái lực dựa trên tương tác riêng giữa chất tan và chất hấp phụ. Trong nghiên cứu polymer sinh học, người ta dùng sắc kí lọc gel (Gel-Filtration Chromatography) dựa trên hình dạng và kích thước phân tử của chất tan, ở đây là các polymer.

Sắc kí lọc gel phân tách các phân tử tuỳ thuộc vào kích thước phân tử khi chúng đi ngang qua một môi trường lọc được chứa đầy trong một cột. Khác với sắc kí trao đổi ion hay sắc kí ái lực, các phân tử không liên kết với môi trường lọc và do đó thành phần của (dung dịch) đệm không ảnh hưởng trực tiếp đến độ phân giải. Ưu điểm lớn nhất của sắc kí lọc gel là các điều kiện có thể thay đổi tuỳ theo mục đích như tinh chế hay phân tích mà không làm thay đổi sự phân tách (separation).

Sắc kí lọc gel rất phù hợp với các phân tử sinh học, là những phân tử rất nhạy với sự thay đổi pH, nồng độ ion kim loại và các điều kiện khác của môi trường. Sự phân tách các phân tử này có thể được tiến hành khi có mặt

của các ion cần thiết, các co-factor, urea, guanidine HCl, lực ion lớn hay nhỏ, ở nhiệt độ phòng hay nhiệt độ thấp tuỳ theo thí nghiệm. Protein có thể được tinh chế theo bất kì dung dịch đệm nào được chọn.



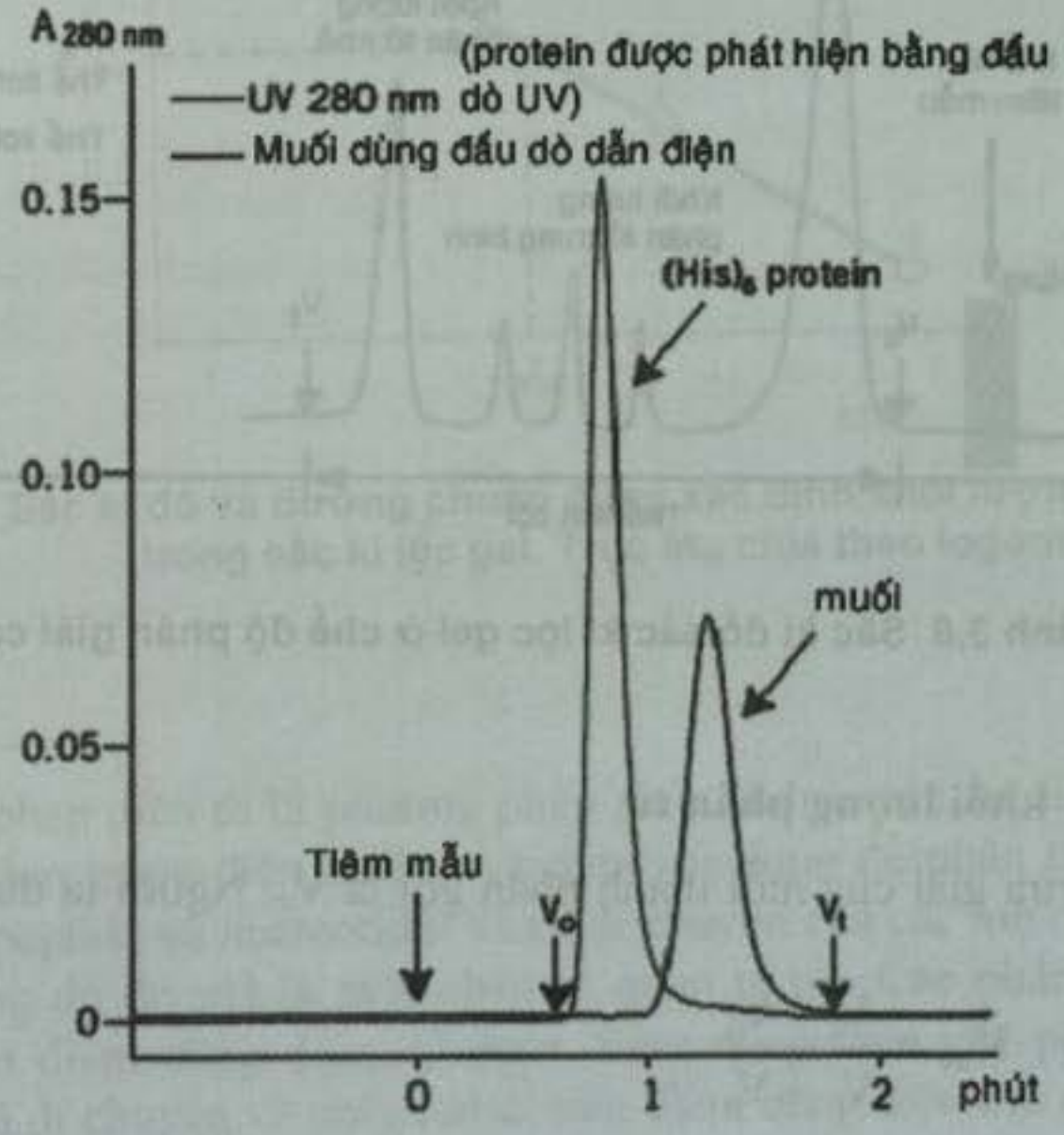
Hình 3.4 Nguyên lí hoạt động của sắc kí lọc gel

Môi trường lọc gel được cấu tạo từ các hạt hình cầu có tính bền hoá lí và có tính trơ như nhựa resin tổng hợp, thuỷ tinh xốp, dextran hay agarose. Chúng có cấu tạo xốp và tạo thành các hệ mao quản và được nhồi đầy vào một cái cột. Khối hạt được nằm cân bằng với dung dịch đệm và dung dịch này chứa đầy các lỗ xốp trong hạt. Dung dịch bên trong các lỗ xốp còn gọi là pha tĩnh nằm cân bằng với dung dịch bên ngoài hạt, gọi là pha động. Quá trình rửa giải không cần dùng các đệm khác nhau.

Khi mẫu được đưa vào, pha động và mẫu sẽ đi qua các hạt xốp trong cột. Các phân tử sẽ khuếch tán vào và ra khỏi các lỗ xốp của hạt. Các phân tử có kích thước nhỏ hơn sẽ đi sâu vào mạng lưới xốp (matrix) của hạt và lưu lại đó lâu hơn. Trong quá trình đệm chảy liên tục qua cột, các phân tử có kích thước lớn hơn các lỗ xốp của mạng lưới sẽ không thể khuếch tán vào trong lỗ và bị đệm kéo đi theo. Kết quả là các phân tử có kích thước lớn nhất sẽ rời khỏi cột đầu tiên và các phân tử có kích thước nhỏ hơn sẽ lần lượt ra sau theo thứ tự. Sắc kí lọc gel có thể dùng theo chức năng phân riêng theo nhóm (group separation mode) hoặc phân đoạn với độ phân giải cao (high resolution fractionation mode).

Phân riêng theo nhóm

Sắc kí lọc gel dùng để phân riêng theo nhóm, theo đó, các phân tử nhỏ như muối, phân tử đánh dấu được lấy ra khỏi các phân tử lớn. Kĩ thuật này được dùng để tinh sạch protein. Các loại môi trường lọc gel sephadex G-10, G-25 và G-50 được dùng cho kĩ thuật này. Sephadex là tên gọi chung môi trường lọc gel cấu tạo từ dextran liên kết ngang. Tuỳ theo kích thước phân tử, người ta chọn các loại sephadex khác nhau. Khi phân riêng theo nhóm, thường dùng thể tích mẫu lớn, có thể chiếm đến 30% thể tích cột và dùng lưu lượng cao, cột ngắn và lớn.

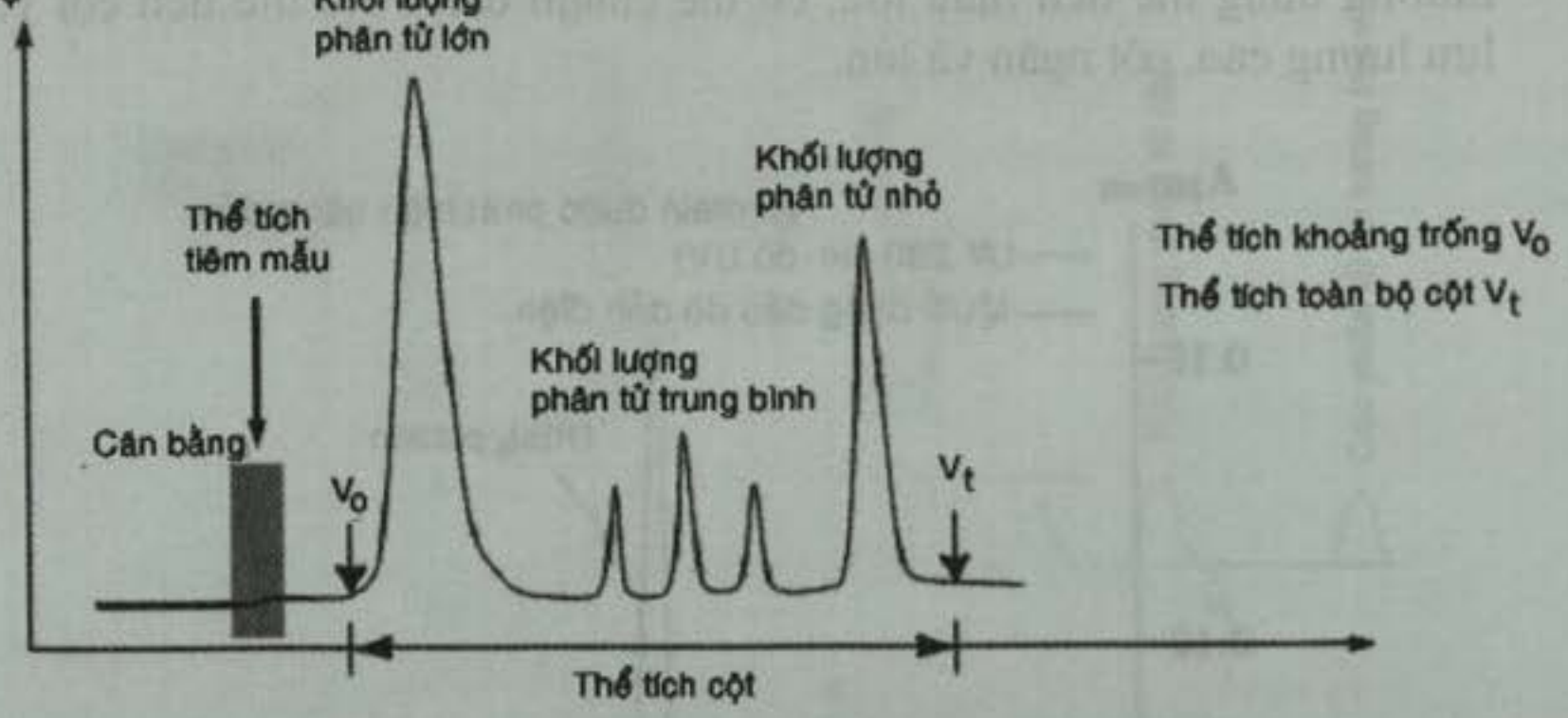


Hình 3.5 Sắc kí đồ phân riêng theo nhóm để loại muối khỏi protein

Phân đoạn với độ phân giải cao

Theo chức năng này, sắc kí lọc gel dùng để tách một hay nhiều thành phần ra khỏi một hỗn hợp, dùng để xác định khối lượng phân tử hoặc dùng để phân tích phân bố khối lượng phân tử của một mẫu. Để thu kết quả có độ phân giải cao, mẫu cần được tinh chế sơ bộ bằng các kĩ thuật sắc kí khác để loại các phân tử có kích thước phân tử gần giống như chất cần phân tích.

Có nhiều nhân tố ảnh hưởng đến độ phân giải (độ phân biệt giữa hai peak) như: thể tích mẫu, tỉ số giữa thể tích mẫu và thể tích cột, kích thước cột, kích thước hạt, phân bố khối lượng của hạt, mật độ khối hạt trong cột, kích thước lỗ xốp trong hạt, lưu lượng dòng, độ nhớt của mẫu và của đệm. Khoảng khối lượng phân tử mà một môi trường lọc gel có thể phân riêng được gọi là độ chọn lọc của môi trường. Độ phân giải phụ thuộc vào độ chọn lọc và hiệu quả của môi trường lọc gel để tạo ra các peak hẹp. Sau khi đã chọn được môi trường lọc gel phù hợp thì thể tích mẫu và kích thước cột là hai thông số quan trọng nhất ảnh hưởng đến độ phân giải.



Hình 3.6 Sắc kí đồ sắc kí lọc gel ở chế độ phân giải cao

Xác định khối lượng phân tử

Thể tích rửa giải của mỗi thành phần gọi là V_e. Người ta đưa ra hệ số phân bố K_{av}

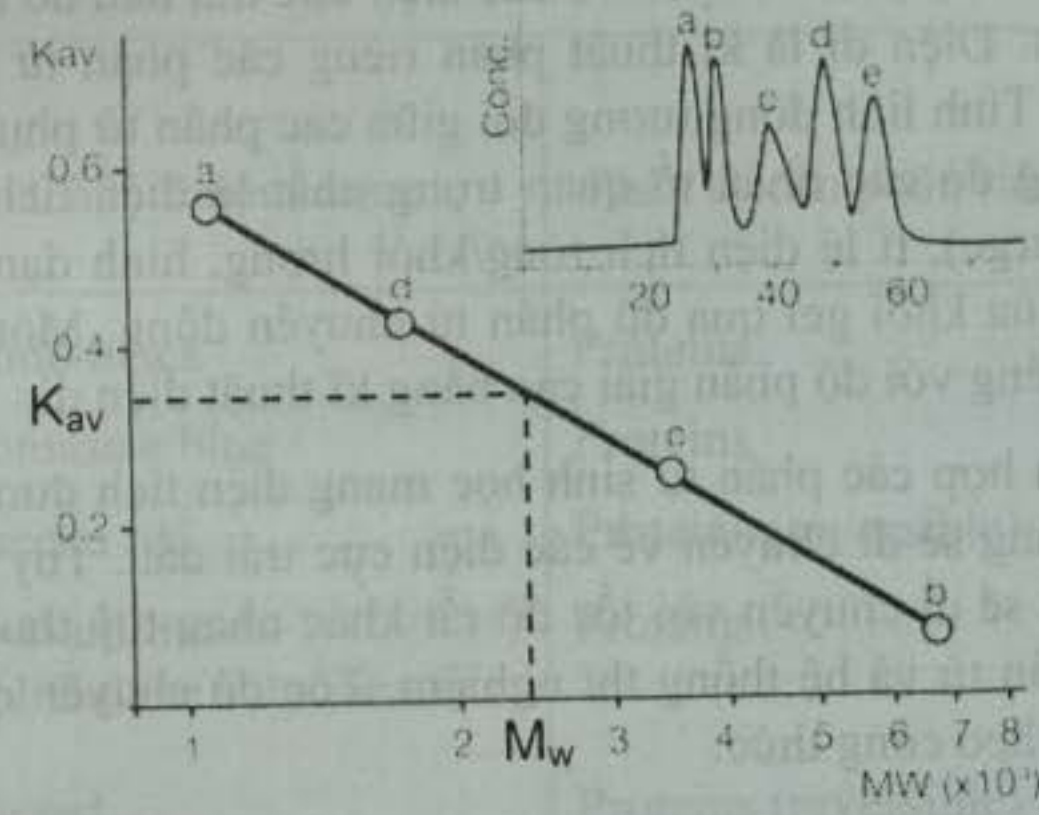
$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Để xác định khối lượng phân tử bằng sắc kí lọc gel người ta làm như sau:

Chuẩn bị cột bằng Blue Dextran 2000 với nồng độ 1mg/ml trong đệm chạy sắc kí. Cho Blue Dextran vào cột, dùng thể tích < 2% thể tích cột V_t để xác định thể tích khoảng trống V_0 và kiểm tra độ chặt của cột. Sau đó hoà tan các chuẩn đã biết khối lượng phân tử vào đệm dùng chạy sắc kí, khuấy nhẹ nhàng không đun nóng với nồng độ do nhà sản xuất quy định.

Tiêm dung dịch chuẩn vào cột với thể tích < 2% thể tích cột V_t. Đo thể tích V_e của từng chuẩn. Tính toán hệ số phân bố K_{av} cho từng chuẩn. Trên đồ thị semilogarit, đặt hệ số K_{av} trên trục tuyến tính và khối lượng phân tử trên trục logarit. Vẽ đường hồi quy biểu diễn quan hệ giữa K_{av} và khối lượng phân tử.

Tiêm mẫu với thể tích < 2% V_t chất cần xác định khối lượng phân tử, đo V_e của nó và tính hệ số K_{av}. Dùng quan hệ hồi quy thu được để tính ra khối lượng phân tử.



Hình 3.7 Sắc kí đồ và đường chuẩn dùng xác định khối lượng phân tử trong sắc kí lọc gel. Trục M_w chia theo logarit

5. Điện di

Phương pháp điện di là phương pháp phân li dựa trên sự di chuyển của các chất tan ion trong điện trường và được sử dụng để phân tích protein, acid nucleic, peptide và nucleotide. Vì sự di chuyển của các ion dựa vào điện tích của chúng do đó pH là một nhân tố quan trọng. Các phân tử sẽ không di chuyển ở điểm đẳng điện. Ở dưới điểm đẳng điện các phân tử tích điện dương và di chuyển về phía catod, trên điểm đẳng điện các phân tử tích điện âm và đi về phía anod.

Để xác định khối lượng phân tử protein, người ta thường dùng điện di SDS-gel. Theo phương pháp này, protein được làm biến tính và tách ra thành các tiểu phần bằng sodium dodecyl sulfate (SDS). Dung dịch SDS chứa protein được nung nóng đến 100^0C trong vài phút để protein duỗi mạch và liên kết với SDS để tạo thành phức chất. Các nhóm dodecyl aliphatic quay vào trong còn các nhóm sulfat hướng ra ngoài bề mặt của phức chất là cho phức chất mang điện tích âm lớn hơn điện tích của mạch acid amin. Các phức chất có dạng hình gậy với đường kính khoảng 18 Å và chiều dài phụ thuộc vào khối lượng phân tử của chuỗi polypeptide. Các phức chất được cho di chuyển trong một khối gel có độ xốp đồng đều từ polyacrylamide. Sau một thời gian, khối gel được lấy ra và nhuộm màu để phát hiện vị trí các protein. Khối lượng phân tử được xác định khi so sánh với chuẩn là các protein đã xác định kích thước phân tử.

Các phân tử sinh học thường mang điện tích, dưới tác dụng của điện trường, các phân tử sinh học di chuyển về các điện cực trái dấu do hiện tượng tương tác tĩnh điện. Điện di là kĩ thuật phân riêng các phân tử mang điện bằng điện trường. Tính linh động tương đối giữa các phân tử phụ thuộc vào nhiều nhân tố trong đó các nhân tố quan trọng nhất là điện tích ròng (điện tích tổng, net charge), tỉ lệ điện tích ròng/khối lượng, hình dạng phân tử, nhiệt độ, độ xốp của khối gel qua đó phân tử chuyển động. Một hỗn hợp có thể được phân riêng với độ phân giải cao bằng kĩ thuật điện di.

Nếu một hỗn hợp các phân tử sinh học mang điện tích được đặt trong điện trường E chúng sẽ di chuyển về các điện cực trái dấu. Tuy nhiên, các phân tử khác nhau sẽ di chuyển với tốc độ rất khác nhau tuỳ thuộc vào tính chất vật lí của phân tử và hệ thống thí nghiệm. Tốc độ chuyển động v của phân tử được tính theo công thức:

$$v = E.q/f$$

Trong đó q là điện tích ròng, f hệ số ma sát.

Hệ số ma sát đặc trưng cho sự cản trở chuyển động của phân tử, nó phụ thuộc vào khối lượng phân tử, cấu hình phân tử, độ nhớt dung dịch đệm, độ xốp của mạng lưới gel. Điện tích ròng (net charge) bằng tổng đại số các điện tích âm và dương trong phân tử. Hai phân tử cùng điện tích ròng nhưng có tỉ số điện tích ròng/khối lượng, cấu hình khác nhau sẽ có tốc độ di chuyển khác nhau.

Trong kĩ thuật điện di, các phân tử sinh học sẽ di chuyển trong dung dịch phân tán trong một mạng lưới gel. Mạng lưới gel đóng vai trò như một cái rây phân tử để giúp cho việc phân riêng các phân tử theo khối lượng phân

tử. Loại gel đem dùng phụ thuộc vào loại phân tử cần phân riêng, điện tích, khối lượng phân tử. Khi phân riêng các protein hoặc acid nucleic, người ta dùng gel làm từ agarose và acrylamide.

Gel agarose cho độ xốp đồng đều hơn tinh bột và có thể thay đổi độ xốp bằng cách thay đổi nồng độ agarose ban đầu khi chuẩn bị. Nồng độ thấp cho lỗ xốp to và ngược lại. Gel agarose được ứng dụng rộng rãi khi phân riêng DNA.

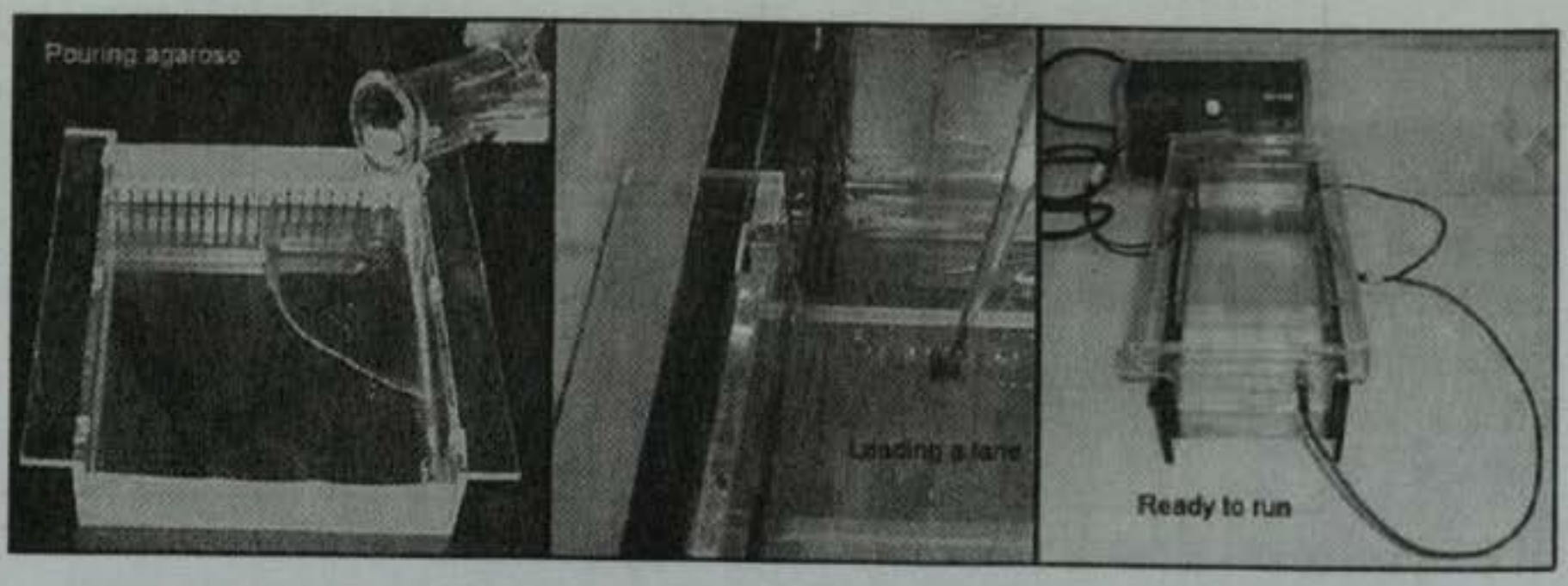
Acrylamide tạo gel bền hơn agarose và có thể dùng cho cả protein và acid nucleic. Khi tạo liên kết ngang với methylene, nó tạo nên mạng lưới gel có độ xốp được kiểm soát tốt hơn, độ bền cao hơn và tính trơ hoá học lớn hơn. Gel này có thể dùng cho các phân tử DNA và protein có dải khối lượng lớn.

Một kĩ thuật để nhân biết vị trí của các phân tử sau khi phân riêng là kĩ thuật nhuộm màu. Có nhiều chất màu được sử dụng như bảng sau:

Chất nhuộm màu	Phân tử cần phân riêng	Giới hạn phát hiện (μg)
Amido black	Proteins	400
Coomassie blue	Proteins	200
Ponceau red	Proteins (reversible)	200
Bis-1-anilino-8-Naphthalene sulphonate	Proteins	150
Nile red	Proteins (reversible)	20
SYPRO orange	Proteins	10
Fluorescamine	Proteins	1
Silver chloride	Proteins/DNA	1
SYPRO red	Proteins	0,5
Ethidium bromide	DNA/RNA	10

Hình 3.8 Kết quả điện di: các dải DNA hiện màu do nhuộm ethidium bromide

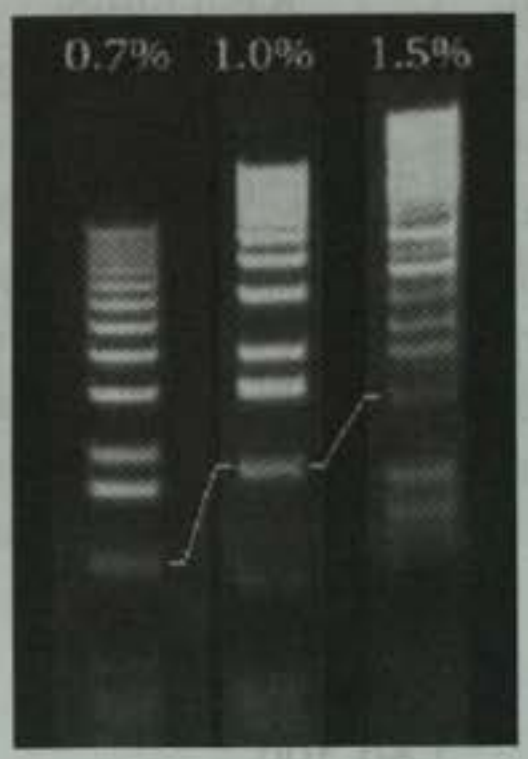
Để chuẩn bị gel, người ta cho bột agarose hay acrylamide vào dung dịch đệm với nồng độ theo yêu cầu, đun sôi dung dịch lên cho các polysaccharide hoà tan. Tuỳ theo kĩ thuật nhuộm màu, có thể thêm ethidium bromide với nồng độ 0,5 µg/ml để phát hiện vị trí DNA sau khi điện di. Sau khi làm nguội đến 60^0C, đổ dung dịch nóng chảy vào một cái khay có gắn lược (để tạo các giếng nạp mẫu sau này) và để yên cho gel tạo thành khi nhiệt độ hạ thấp đến nhiệt độ phòng. Sau khi gel đã rắn, lấy lược ra cẩn thận không làm hỏng các giếng. Gel vẫn nằm trên khay nhựa được cho vào buồng điện di và đổ đệm ngập lên. Mẫu được nạp vào các giếng bằng các micropipette. Sau đó đậy nắp có gắn điện cực lên buồng điện di và cho bộ nguồn hoạt động với điện áp quy định. Các DNA mang điện tích âm sẽ di chuyển về phía điện cực dương có đánh dấu màu đỏ.



Hình 3.9 Các bước chính của điện di: tạo gel, nạp mẫu và chạy điện di

Nồng độ gel

Gel agarose: hàm lượng agarose phụ thuộc vào kích thước của phân tử cần phân riêng. Hàm lượng agarose tính theo phần trăm khối lượng agarose trong thể tích dung dịch đệm (w/v), thông thường từ 0,2% đến 3%. Hàm lượng agarose càng thấp, phân tử DNA chuyển động càng nhanh. Nhìn chung, khi phân riêng các đoạn DNA lớn, người ta dùng hàm lượng agarose nhỏ, khi phân đoạn DNA nhỏ, dùng gel có hàm lượng agarose lớn.



Hình 3.10 Ảnh hưởng của nồng độ gel agarose đến độ phân giải

Chú ý nồng độ thấp 0,7% cho độ phân giải tốt ở các phân tử lớn và nồng độ cao 1,5% cho độ phân giải tốt ở các phân tử bé.

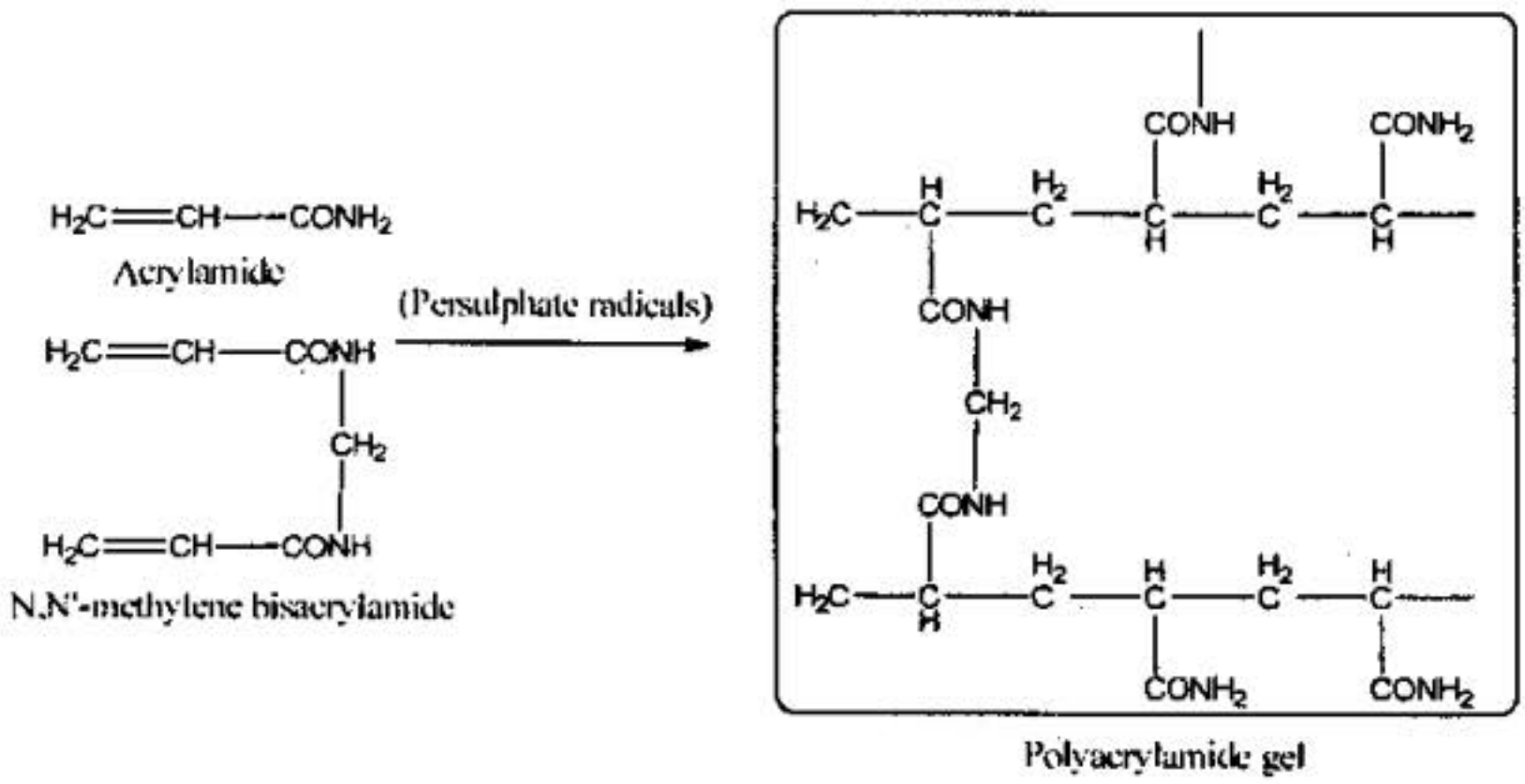
Bảng 3.2 Hàm lượng agarose trong gel tương ứng với các dải kích thước DNA

Hàm lượng agarose (%)	Dải kích thước DNA (bp)
0,2	5000 - 40 000
0,4	5000 - 30 000
0,6	6300 - 10 000
0,8	1000 - 7000
1,0	500 - 5000
1,5	300 - 3000
2,0	200 - 1500
3,0	100 - 1000

Đối với gel acrylamide, cần xác định nồng độ và tỉ lệ chất liên kết ngang, tạo thành gel kích thước lỗ xốp mong muốn. Nồng độ acrylamide càng cao, độ xốp nhỏ và dùng cho các phân tử có kích thước nhỏ và ngược lại. Người ta thường dùng tỉ lệ acrylamide/bisacrylamide là 19:1 (tỉ lệ chất tạo liên kết ngang là 5%) và 29:1 (tỉ lệ chất liên kết ngang là 3,3%) như bảng.

Bảng 3.3 Hàm lượng và tỉ lệ chất tạo liên kết ngang trong gel acrylamide để phân riêng DNA/RNA

Tỉ lệ acrylamide/bis	Gel (%)	Kích thước DNA/RNA tự nhiên	Kích thước DNA/RNA biến tính
19:1			
	4	100-1500	70-500
	6	60-600	40-400
	8	40-500	20-200
	10	30-300	15-150
	12	20-150	10-100
29:1	5	200-2000	70-800
	6	80-800	50-500
	8	60-400	30-300
	10	50-300	20-200
	12	40-200	15-150
	20	<40	<40



Hình 3.11 Phân tử acrylamide và bisacrylamide tạo gel polyacrylamide

Phương pháp điện di có nhiều ứng dụng như xác định kích thước các phân tử DNA, phân tích các sản phẩm PCR trong chẩn đoán di truyền phân tử hay đánh dấu di truyền, phân riêng các DNA trước khi tiến hành các kĩ thuật chuyển Southern hay Northern, phân tích protein, peptid.

Để xác định khối lượng phân tử protein, người ta thường dùng điện di SDS-gel. Theo phương pháp này, protein được làm biến tính và tách ra thành các tiểu phần bằng sodium dodecyl sulfate (SDS). Dung dịch SDS chứa protein được nung nóng đến 100^0C trong vài phút để protein duỗi mạch và liên kết với SDS để tạo thành phức chất. Các nhóm dodecyl aliphatic quay vào trong còn các nhóm sulfat hướng ra ngoài bề mặt của phức chất làm cho phức chất mang điện tích âm lớn hơn điện tích của mạch acid amin. Các phức chất có dạng hình gậy với đường kính khoảng 18 Å và chiều dài phụ thuộc vào khối lượng phân tử của chuỗi polypeptide. Các phức chất được cho di chuyển trong một khối gel có độ xốp đồng đều từ polyacrylamide. Sau một thời gian, khối gel được lấy ra và nhuộm màu để phát hiện vị trí các protein. Khối lượng phân tử được xác định khi so sánh với chuẩn là các protein đã xác định kích thước phân tử.

PHẦN 2: CÁC POLYMER SINH HỌC BIỂN CÓ NGUỒN GỐC THỰC VẬT

CHƯƠNG 4

AGAR

1. Sơ lược lịch sử, thuật ngữ

Agar là một loại keo ưa nước được tách chiết từ một số loài rong biển thuộc ngành rong đỏ. Nó không tan trong nước lạnh nhưng tan trong nước nóng. Dung dịch 1.5% agar khi làm lạnh đến khoảng nhiệt độ 32 – 43^{0}C sẽ tạo gel và gel này sẽ nóng chảy ở 85^{0}C. Agar là một polysaccharide cấu tạo từ các monomer là galactose trong đó các gốc bị suphat hoá ở mức độ khác nhau.

Agar có xuất xứ từ Nhật Bản. Từ xưa đến hiện nay, agar được sản xuất và bán dưới dạng lỏng (nóng) hoặc dạng gel (nguội). Từ thế kỉ XVIII, sản xuất agar được công nghiệp hoá và tạo ra sản phẩm khô, tiếng Nhật gọi là *kanten*. Mặc dù vậy tên gọi agar-agar lại có xuất xứ từ Mã Lai. Các nước nói tiếng Pháp và Bồ Đào Nha gọi là *gelose*.

Agar được sản xuất theo công nghệ hiện đại đầu tiên tại California theo patent của Matsuoka năm 1922. Theo công nghệ này người ta làm đông lạnh để tách nước. Trong thế chiến thứ hai, việc sản xuất agar tại Mĩ được chính phủ hỗ trợ để có đủ môi trường cho việc nuôi cấy tế bào.

Agar có thể sản xuất từ các loài rong khác nhau nên các tính chất của chúng có thể khác nhau. Do đó khi nói đến agar, người ta hay nói đến nguồn gốc của nó, từ đó có loại agar Gelidium, agar Gracilaria, agar Pterocladia...Để mô tả chính xác hơn, người ta còn nêu lên xuất xứ của rong biển để nấu agar như Gracilaria ở Chile khác ở Argentina hay Gelidium ở Tây Ban Nha khác ở Mexico.

Tính chất của agar từ rong Gelidium khác với các agar từ các loài rong khác, do đó người ta gọi agar chính gốc là từ Gelidium, còn các loại rong khác tách ra thì gọi là agaroid. Hai loài rong chính thống thường làm agar của Nhật là *Gelidium pacificum* và *Gelidium amansii*.

Các loại rong sản xuất agar hiện nay trên thế giới có các nhóm chính là:

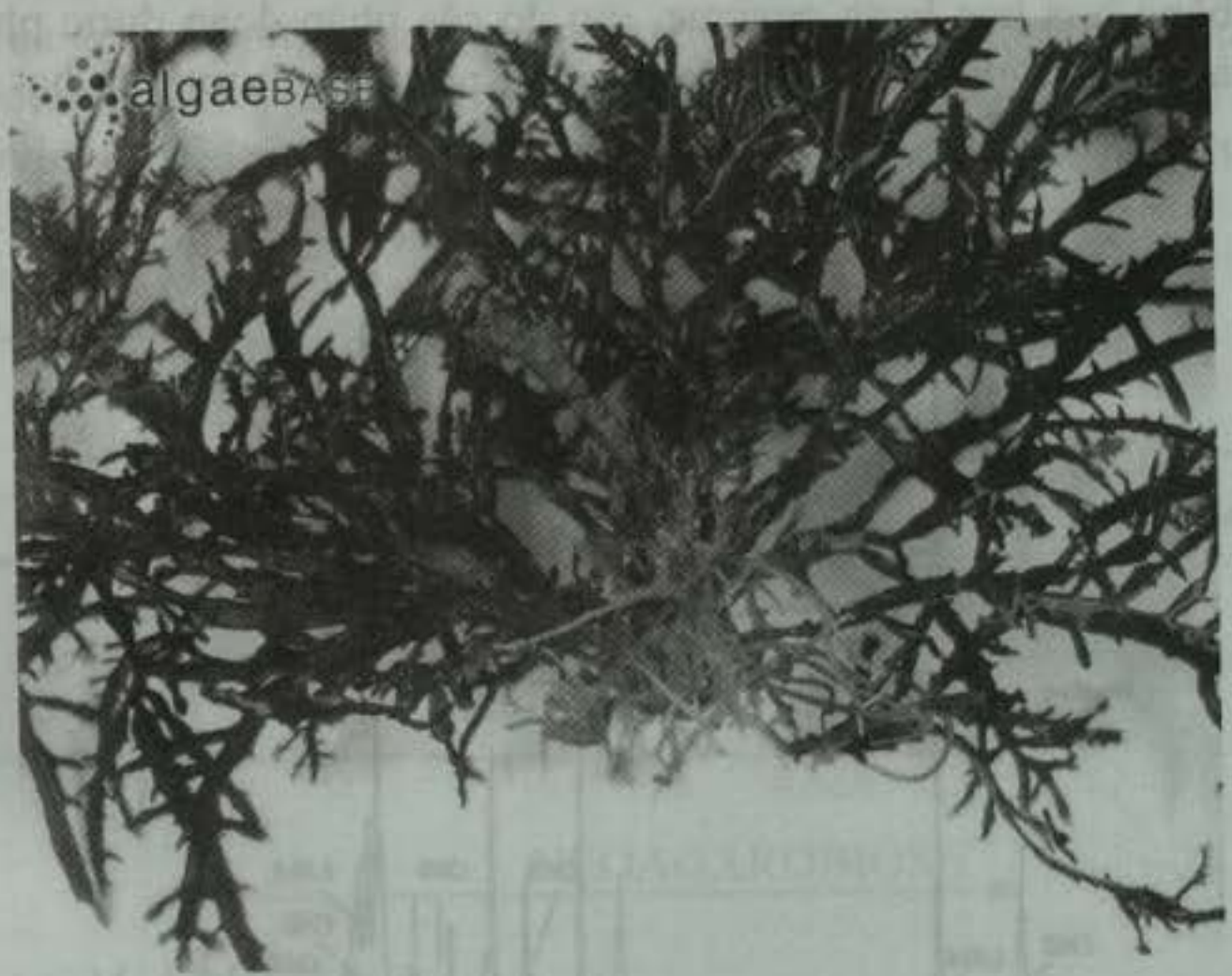
1. Gelidium ở Tây Ban Nha, Bồ Đào Nha, Nhật Bản, Hàn Quốc, Mexico, Mĩ, Trung Quốc, Chile và Nam Phi.

2. Gracilaria ở Chile, Argentina, Nam Phi, Nhật Bản, Brazil, Peru, Indonesia, Trung Quốc, Ấn Độ, Việt Nam và Sri Lanka.

3. Pterocladia capillace ở Bồ Đào Nha và Pterocladia ở New Zealand.

4. Gelidiella từ Ai Cập, Madagasca, Ấn Độ.

Ngoài ra còn một số loài rong khác như Ahnpheltia plicata, Acanthopheltis japonica. Ceramiun hypnaeordes và Ceranium boydenii.



Gelidium pacificum (www.algaebase.org)

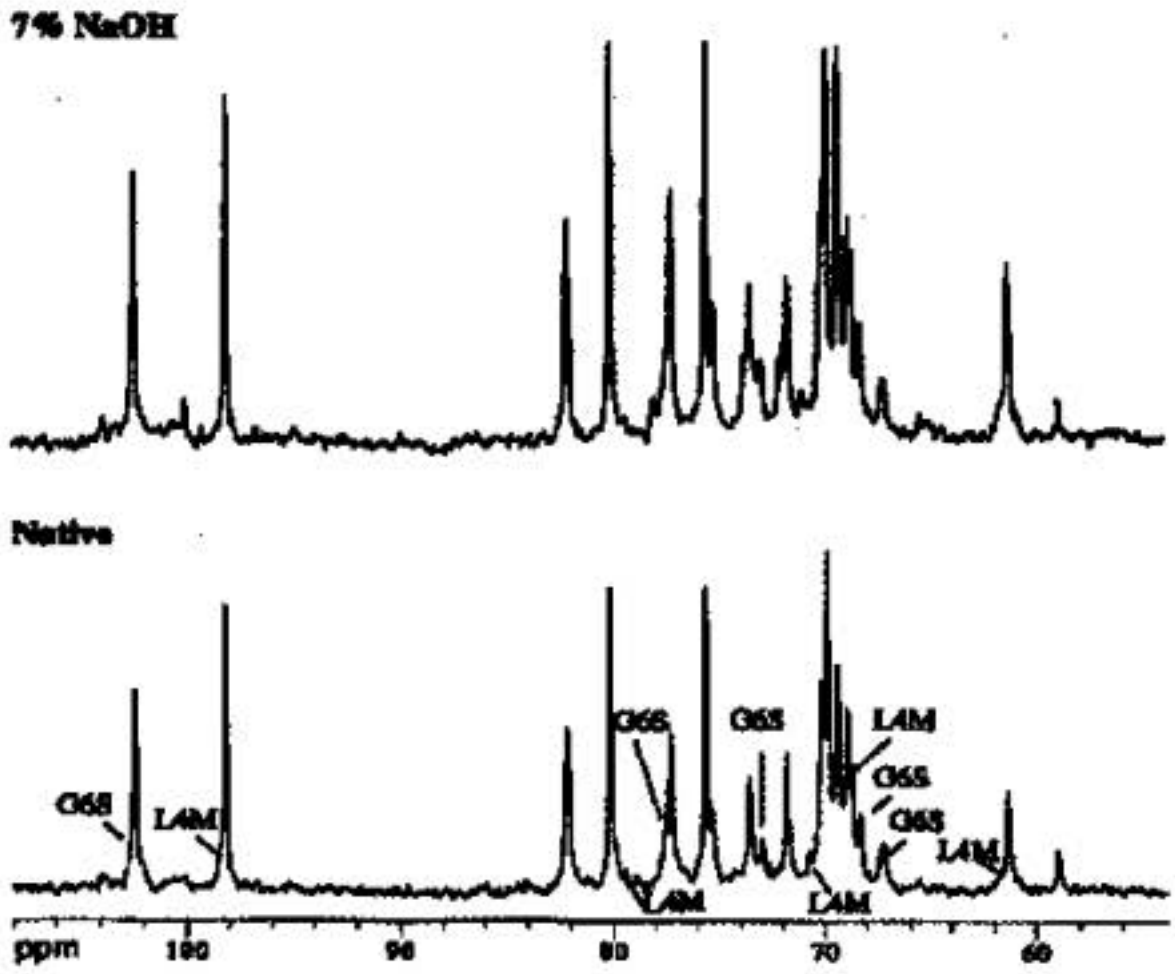
Gracilaria verrucosa (www.aquaportail.com)

Hình 4.1 Một số loài rong dùng sản xuất agar

2. Cấu trúc hoá học

Các công trình nghiên cứu đầu tiên cho thấy agar có chứa 3,6-anhydro-galactose và các gốc sulfate đính vào carbohydrate.

Các nghiên cứu cấu trúc agar dựa trên việc thuỷ phân agar thành các phân đoạn bằng hoá học hoặc enzyme, sau đó các phân đoạn được phân tích cấu trúc bằng các kĩ thuật phổ hồng ngoại IR, phổ cộng hưởng từ hạt nhân.



Hình 4.2 Phổ ^{13}C của agar tự nhiên và agar xử lí với 7% NaOH từ Gracilaria cervicornis. G6S và L4M tương ứng liên kết vị trí số 3 của 6-O-sulphate-D-β-galactose và 4-O-methyl-α-L-galactose. (Y.Freile-Pelegrin, 2005).

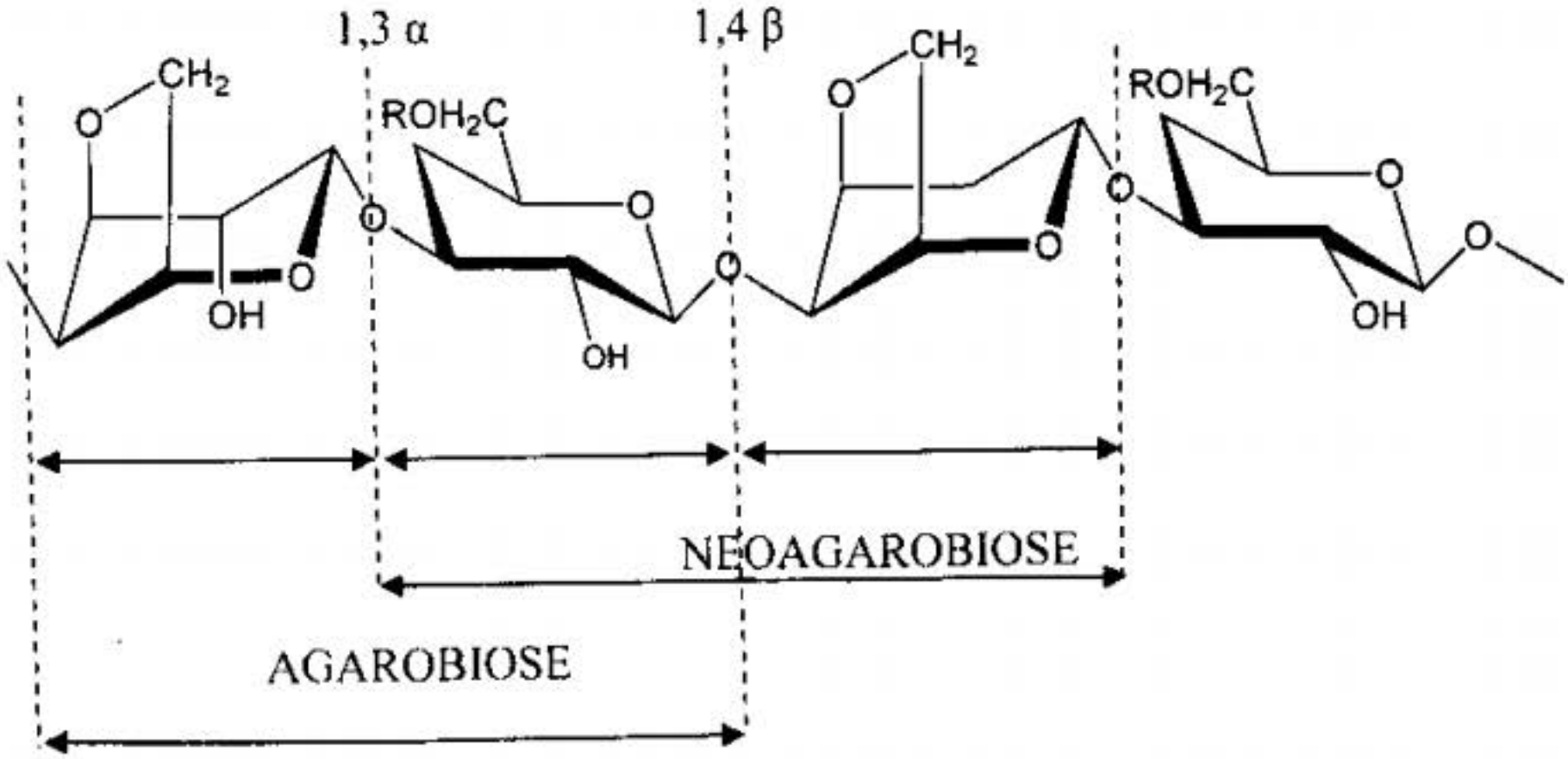
Hiện nay, người ta đã xác nhận được agar cấu tạo từ hai phân đoạn, agarose và agaropectin. Sau đây ta sẽ xét chi tiết cấu trúc của từng phân đoạn.

Agarose

Agarose có cấu tạo mạch thẳng bởi các gốc β-D-galactopyranose nối với 3,6-anhydro-L-galactose qua các liên kết 1-3 và liên kết 1-4. Hai monomer này liên kết luân phiên với nhau. Độ bền của các liên kết 1-3 và 1-4 khác nhau đối với các tác nhân enzyme và hoá học.

Liên kết 1,3 α dễ bị phân cắt bởi các enzyme và tạo thành các neoagarobiose. Trong khi đó các liên kết 1,4 β dễ bị phân cắt bởi acid và tạo ra các agarobiose. Khối lượng phân tử của agarose khi chưa phân cắt khoảng 120 000 Dalton tương ứng 800 gốc đường đơn hexose.

Mặc dầu cấu trúc agarose được mô tả như trên, phụ thuộc vào nguồn gốc loài rong, một số gốc 3,6 anhydro L galactose có thể được thay thế bởi L galactose. Một số gốc D galactose và L galactose có thể bị methyl hoá và trở thành 6-0-methyl-D-galactose và 2-0 –methyl-L-galactose. Sự methyl hoá này xuất xứ từ nguồn gốc rong, nó xác định điểm tạo gel (gel point) và xuất xứ của agar. Người ta còn tìm thấy D-xylose với lượng rất nhỏ nhưng chưa xác định được vị trí nó gắn vào phân tử agarose. Các gốc phân cực như acid pyruvic và acid sulfuric cũng được tìm thấy trong agarose với lượng rất nhỏ.



Hình 4.3 Cấu trúc phân đoạn agarose

Hiện nay, các loại agarose dùng trong kĩ thuật phân riêng sinh học có cấu trúc đã được thay đổi khác với khi nó được tách ra từ rong.

Agarose xác định khả năng tạo gel của agar trong môi trường nước.

Agaropectin

Agaropectin là phân đoạn có khả năng tạo gel yếu trong nước. Cho đến nay, người ta chưa xác định hoàn toàn cấu trúc của nó. Người ta cho rằng nó được tạo bởi liên kết luân phiên giữa D-glactose và L-galactose và tất cả các nhóm phân cực tìm thấy trong phân tử agar. Các gốc L-galactose-6-sulfate và D-glactose-4-sulfate là các gốc chứa sulfate chủ yếu của agar. Tồn tại một lượng nhỏ 3,6-anhydro-L-galactose. Các lượng nhỏ này phụ thuộc vào nguồn gốc rong, mùa vụ và phương pháp tách chiết.

Sự có mặt của 4,6-0-(1-carboxyethylidene)-D-galactose cũng được xác nhận làm cho vị trí của acid pyruvic trong cấu trúc trở nên rõ ràng. Lượng acid pyruvic trong agar và agarose thay đổi từ 0,2-2,5% trong agar và 0,02 -1,3%

trong agarose (Hirase 1957). Những thay đổi đó có thể do loài rong, do khí hậu khác nhau của vùng mà rong mọc.

Người ta còn tìm thấy D-glactose-2,6-disulfate với một lượng nhỏ trong agaropectin từ những loài rong mọc trong điều kiện khí hậu khắc nghiệt (như hiện tượng El Nino). Các agaropectin này có độ nhớt cao với khả năng tạo gel thấp. Khi đó agar và agaropectin có những tính chất không mong muốn. Acid glucuronic cũng được tìm thấy ở dạng vết.

Như vậy, mặc dù cấu trúc cơ bản của agaropectin là liên kết luân phiên giữa D-galactose và L-galactose, một số D-galactose có thể được thay thế bởi D-galactose-4-sulftate, bởi 4,6-0-(1-carboxyethylidene)-D-galactose ở một số vị trí cuối mạch, hay ngay cả bởi D-glactose-2,6-disulfate. Trong khi đó L-galactose có thể được thay thế bởi 3,6-anhydro-L -galactose. Điều này làm cho cấu trúc của agar thay đổi trong một dải rộng và đó cũng là tính chất chung của các polymer sinh học trong tự nhiên.

Bảng 4.1 Các gốc trong phân đoạn agaropectin (Mc.Hugh,1987)

L-galactose	D-galactose
3,6-anhydro-L-glactose	D-galactose-4-sulfat
L-galactose-6-sulfat	D-galactose-2,6-disulfat
Acid glucuronic	4,6-O-(1-carboxyethylidene)-D-galactose

3. Tính chất

Agar có các tính chất quan trọng sau đây:

1. Agar là loại polymer sinh học có khả năng tạo gel lớn nhất trong môi trường nước và cho gel chắc hơn các loại polymer khác với cùng nồng độ.

2. Agar có khả năng tạo gel chỉ với môi trường nước mà không cần thêm bất kì tác nhân tạo gel nào. Đây là điểm khác biệt căn bản của agar.

3. Gel agar có thể tồn tại trong một dải rộng của pH từ 5 đến 8.

4. Agar có độ bền nhiệt cao, cho phép chịu được chế độ thanh trùng trên 100^0C.

5. Dung dịch 1,5% agar tạo gel ở nhiệt độ từ 32 đến 43^0C và nóng chảy ở 85^0C. Đây là tính chất duy nhất của agar so với các chất tạo gel khác.

6. Gel agar không có mùi vị lạ và không cần dùng các ion tạo gel có vị gắt như kali, canxi.

7. Agar có tính tương thích mùi và làm dậy mùi thực phẩm pha vào, do đó nó có tính cố định mùi của thực phẩm lâu dài trên gel.

8. Gel agar có tính thuận nghịch rất tốt khi làm đông và đun nóng chảy nhiều lần mà vẫn giữ được tính chất.

9. Gel agar trong suốt và dễ nhuộm màu do đó dùng làm thực phẩm có nhiều màu rất đẹp.

10. Gel agar ổn định. không kết tủa khi có mặt các ion dương.

Độ bền gel (sức đông agar)

Một trong những thông số quan trọng là độ bền gel. Nó nói lên chất lượng agar và do đó quyết định giá thành. Để đo độ bền gel, người ta tác động lực lên khối gel agar cho đến khi nó bị vỡ trong vòng 20 giây theo phương pháp Nikan-Sui. Ứng suất khi gel vỡ xác định độ bền gel, tính bằng g/cm^2. Cách tiến hành như sau: chuẩn bị dung dịch agar 1,5% nóng và rót vào một hộp kim loại có kích thước cạnh đáy 6×30 cm, cao 4,5 cm đến chiều cao mức lỏng là 3 cm, để nguội đến 20^0C. Tác dụng lực qua các quả cân lên một đầu ép có diện tích 1 cm^2. Khi gel vỡ, tính tổng trọng lượng các vật nặng tác dụng lên đầu ép.

Độ bền gel xác định cho gel ở nồng độ 1,5%, agar công nghiệp có độ bền gel từ 600 đến 1100 g/cm^2. Độ bền gel trung bình từ 700-800 g/cm^2.

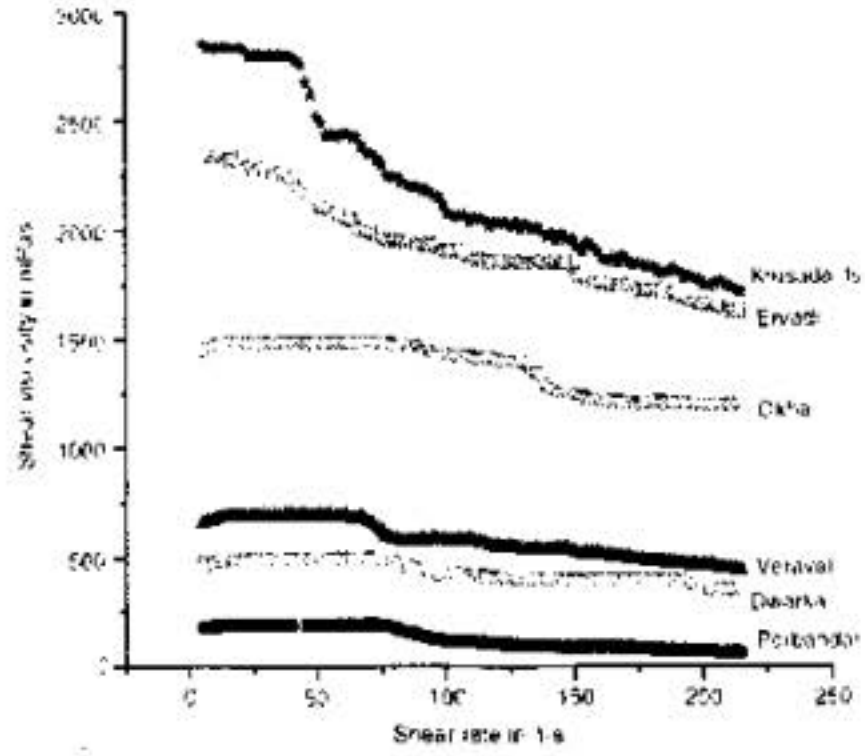
Hiện nay người ta dùng các máy đo lưu biến hiện đại cho phép xác định trực tiếp quan hệ ứng suất biến dạng cho đến khi gel vỡ.

Cấu trúc và sự tạo thành gel

Gel agar có cấu trúc xoắn được xác định bằng phương pháp nhiễu xạ tia X. Vì rằng agar chứa 3,6-anhydro-L-galactose, gel có cấu trúc xoắn trái. So với gel carrageenan, gel agar có bước xoắn nhỏ hơn 26 Å vì chứa ít nhóm sulfate hơn. Khi chứa ít nhóm sulfate, vòng xoắn của gel sẽ chặt hơn và gọn hơn.

Khi dung dịch nóng, agar ở dạng hoà tan, các phân tử agar nằm ngẫu nhiên trong dung dịch. Khi nhiệt độ thấp dần, các phân tử tiến đến gần nhau và bắt đầu cuộn xoắn vào nhau do các liên kết hydro. Quá trình tạo gel bắt đầu. Các đoạn xoắn diễn ra giữa các phần của chuỗi phân tử khác nhau tạo nên mạng lưới gel ba chiều, có những vùng xoắn (vùng nối) và vùng ngắt (không xoắn). Do cấu trúc gel như vậy sẽ tạo thành không gian giữ nước bên trong. Quá trình tạo gel sẽ bị ngăn cản nếu ta cho vào các tác nhân bắt giữ proton như urea hay guanidine. Khi sấy khô agar, các phân tử đang liên kết hydro ở dạng gel khô và do đó không thể hoà tan vào nước lạnh vì nó vẫn giữ nguyên các liên kết hydro trước khi làm khô.

Ở trên điểm tạo gel, dung dịch agar thể hiện là chất lỏng có độ nhớt giảm khi tốc độ trượt tăng lên (thinning behaviour). Có thể thấy điều này trong công trình của Kamalesh Prasad (2007).



Hình 4.4 Động thái gel thining của các gel agar khác nhau (1,5%) từ rong Gelidiella acerosa tại những nơi khác nhau ở 45^{0}C. Trục tung là độ nhớt động lực, trục hoành là tốc độ trượt. Kamalesh Prasad (2007)

Một tính chất cơ bản của gel agar là độ trễ tạo gel, gelation hysteresis. Một dung dịch agar trong nước khi làm lạnh sẽ tạo gel trong khoảng 32-43^{0}C tuỳ theo loại rong vì có hàm lượng nhóm methyl khác nhau. Tuy nhiên khi nung nóng trở lại, phải đến 85^{0}C, gel mới tan chảy. Sự khác biệt lớn giữa nhiệt độ tạo gel và nhiệt độ nóng chảy gel là một đặc điểm của agar so với các loại keo rong biển khác. Điều này được giải thích là do liên kết giữa hai phân tử agar rất bền do mật độ cao của các liên kết hydro giữa hai mạch phân tử. Do đó phải cần đến nhiệt độ cao để phá vỡ các liên kết này. Còn liên kết giữa phân tử agar và nước kém bền hơn. Khi làm lạnh, giai đoạn chuyển sol-gel xảy ra trong khoảng nhiệt độ từ 40^{0}C đến 30^{0}C chia ra thành ba giai đoạn: giai đoạn khởi đầu, giai đoạn tạo gel và giai đoạn giả cân bằng (Pseudo-equilibrium). Sau đó gel giả (pseudogel), tạo thành ở khoảng 30^{0}C, tiếp tục phát triển về cấu trúc theo thời gian do hiện tượng syneresis.

Trong dung dịch nước, do các nhóm hydroxyl và nhóm sulfate trong phân tử agar tạo thành các liên kết hydro với các phân tử nước, các vùng tương tác giữa các phân tử và trong nội bộ phân tử hình thành hai loại phân tử: loại kết hợp và loại không kết hợp. Trạng thái sol tồn tại hai loại hạt có kích thước khác nhau: loại hạt đơn có kích thước từ 20-50 nm và loại hạt kết hợp có kích thước 200-700 nm. Khi hạ nhiệt độ đến khoảng 40^{0}C, bán kính thuỷ lực của các hạt tăng dần lên và chuyển từ cấu hình hạt sang cấu hình gậy và mạng lưới gel bắt đầu được hình thành làm tăng tính dị thể của cấu trúc. Khi

một mạng lưới gel nhỏ được hình thành, nó sẽ nằm cân bằng động với cả mạng lưới, nghĩa là nó sẽ bị xáo trộn và phục hồi thường xuyên sau một khoảng thời gian, sau đó khi các phân tử agar tham gia vào mạng lưới nhiều hơn, nó sẽ dần dần đạt đến trạng thái cân bằng bền hơn. Như vậy trong quá trình tạo gel, có sự phát triển của các vùng nhỏ thành các vùng lớn (macrodomain) hơn. Một điều đáng chú ý là người ta quan sát thấy các vùng nhỏ (microdomain) tồn tại ngay cả ở trạng thái sol rất xa điểm bắt đầu tạo gel. Quá trình tạo gel agar hiện nay đang được nghiên cứu sâu xa hơn và các bước tạo gel đã được làm sáng tỏ dần (Boral và cộng sự, 2008).

Sau khi tạo thành gel, khối gel nước agar (agar hydrogel) tiếp tục biến đổi cấu trúc theo thời gian theo một hiện tượng gọi là syneresis, tạo nên áp suất thẩm thấu nội trên mạng lưới gel. Ứng suất này thay đổi theo dạng xung (pulsating mode) hay còn gọi là dạng hô hấp của gel (breathing mode). Người ta quan sát thấy hiện tượng trương nở gel tiếp theo là co rút được vận hành bởi hai thành phần là áp suất thẩm thấu và ứng suất đàn hồi. Khi cho khối gel tiếp xúc với nước, thoạt tiên khi áp suất thẩm thấu lớn hơn ứng suất đàn hồi, gel sẽ tập trung nước vào bề mặt của nó và trương nở đến trạng thái trung gian. Về cấu trúc khi đó các đoạn mạch phân tử không tham gia xoắn đôi đang có cấu hình uốn gấp khúc sẽ duỗi thẳng ra và làm cho khối gel tăng thể tích và hút nước vào mạng lưới gel. Sau đó ứng suất đàn hồi trở nên lớn hơn áp suất thẩm thấu và làm khối gel co rút, tạo lực ép làm cho nước gần bề mặt khối gel thoát ra ngoài. Quá trình đạt cân bằng khi hai lực nói trên cân bằng (Boral và cộng sự, 2010).

4. Tách chiết

Khi tách chiết agar, người ta mong muốn thu nhận càng nhiều agar trong rong càng tốt và sao cho agar có được tính chất mong muốn tốt nhất. Để làm được điều đó, cần phải chú ý các điểm cơ bản sau đây:

1. Xử lí rong trước khi chiết.

2. Kiểm soát được khối lượng phân tử trong quá trình tách chiết.

3. Loại bỏ bã rong và các tạp chất.

4. Thu hồi agar từ một thể tích dịch chiết lớn.

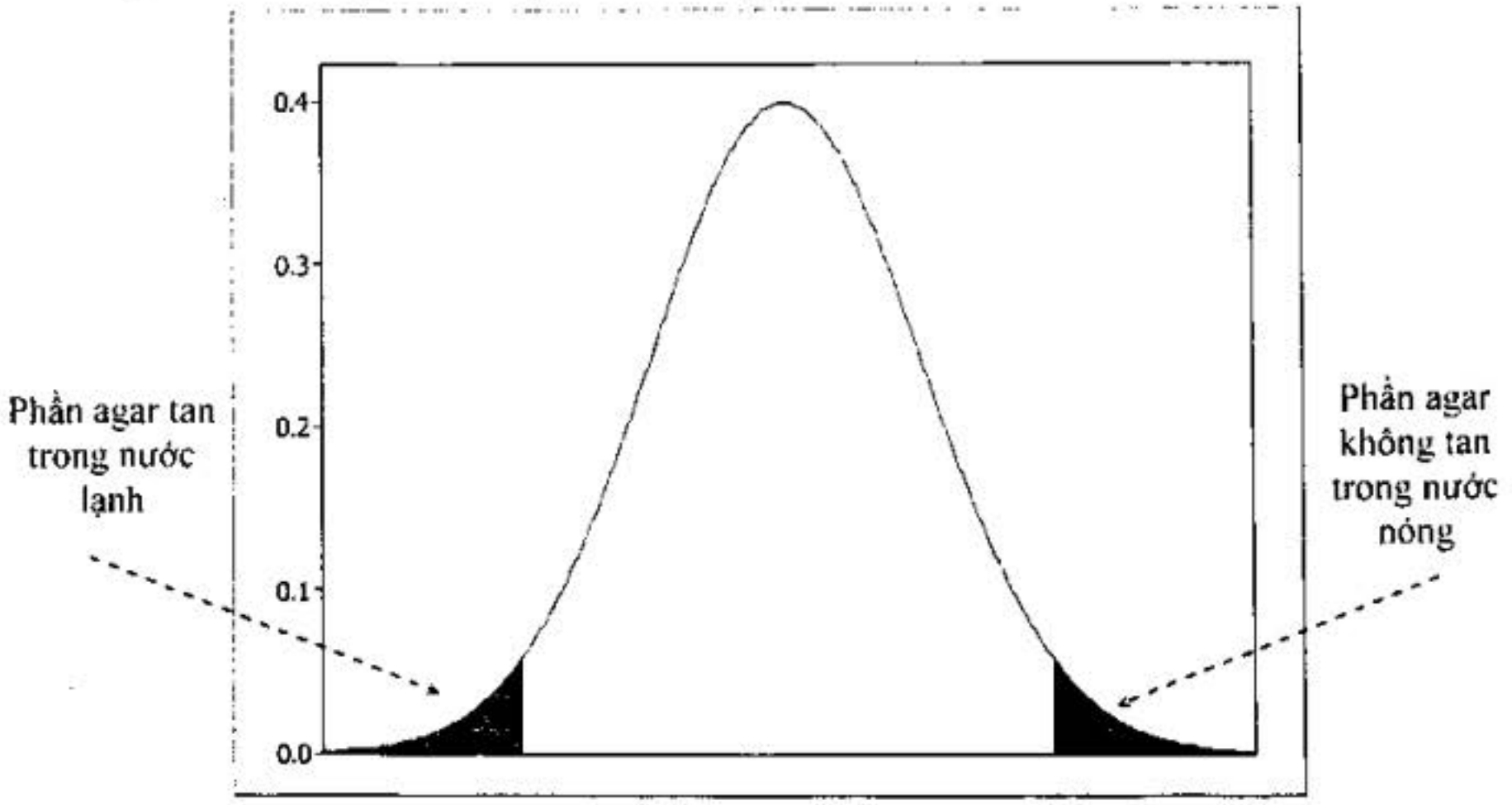
Xử lí rong trước khi chiết

Để thu được agar có sức đông tốt, người ta cần phải xử lí rong trước khi chiết, nhất là các loài rong không phải là Gelidium. Đó là do trong các rong đó, ví dụ như Gracilaria, phân tử agar có chứa nhiều gốc sulfate mà các gốc này sẽ làm giảm sức đông agar. Do đó khi xử lí rong bằng kiềm trước khi nấu chiết, các gốc sulfate sẽ bị thuỷ phân và cho agar có chất lượng cao. Cụ thể là các gốc L-galactose-6 sulfate sẽ chuyển thành 3,6-anhydro-L-

galactose và làm tăng độ bền gel. Có ba nhân tố chính là nồng độ dung dịch NaOH, nhiệt độ xử lí và thời gian xử lí. Tuỳ theo loài rong khác nhau, chúng ta có thể dùng phương pháp thiết kế và phân tích thí nghiệm để tìm ra chế độ xử lí tối ưu trong trường hợp cụ thể. Nồng độ NaOH thường dùng từ 0,25-0,5%, nhiệt độ 80-90^{0}C, thời gian 3-5h. Cần chú ý là ở điều kiện khắc nghiệt khi xử lí, sẽ bị tổn thất agar và nếu các điều kiện không được kiểm soát, sự tổn thất này có thể nghiêm trọng.

Kiểm soát khối lượng phân tử trong quá trình tách chiết

Khi tách chiết agar, người ta dựa vào đặc điểm của agar là không tan trong nước lạnh và tan trong nước nóng. Nhưng nếu phân tử quá dài, việc hoà tan sẽ lâu. Do đó cần phải thuỷ phân một phần để có các phân tử ngắn hơn, và do đó dễ tan ra trong dung dịch chiết. Nhưng nếu thuỷ phân mạnh hơn, các phân tử quá ngắn sẽ có khả năng hoà tan trong nước lạnh và không thu hồi được. Như vậy khi tách chiết agar, cần tránh cả hai trường hợp, một là các phân tử agar quá lớn sẽ nằm lại trong cây rong mà không tan vào dung dịch, hai là các phân tử quá ngắn sẽ tan trong nước lạnh và không thu hồi được. Như vậy sự phân bố khối lượng phân tử khi nấu chiết có ý nghĩa quan trọng, sao cho diện tích dưới đường cong phân bố ở cả hai phía, tan trong nước lạnh và không tan trong nước nóng phải đủ nhỏ.



Hình 4.5 Phân bố khối lượng phân tử agar khi tách chiết

Tách bã rong và các tạp chất

Khi nấu chiết, ta thu được một dịch nhớt bao gồm agar hoà tan, muối khoáng, sắc tố rong, cellulose, hemicellulose và nhiều chất khác đến từ các tạp chất lẫn theo rong. Do đó cần phải lọc để loại bỏ các tạp chất không tan.

Khó khăn trong giai đoạn này là dịch chiết nóng, từ 85-100^{0}C nhưng phải lọc nóng để độ nhớt nhỏ, do đó cần cẩn thận khi thao tác.

Tách nước

Do agar hoà tan với nồng độ nhỏ trong dịch chiết, khoảng 0,8-1,5%, cần phải dùng một lượng lớn nước để nấu chiết. Chính lượng nước lớn này sẽ là khó khăn chính khi cần phải tách nước sau này.

Có các phương pháp có thể dùng để tách nước, đó là bốc hơi, kết tủa, làm đông và ép. Phương pháp bốc hơi không kinh tế vì tiêu tốn rất nhiều năng lượng để cung cấp nhiệt hoá hơi cho nước. Ví dụ dịch chiết chứa 1% agar, vậy để thu hồi 1 kg agar trong 100 kg dịch chiết, cần làm bay hơi 99 kg nước. Năng lượng cần dùng rất lớn vì nhiệt hoá hơi của nước là 539 kcal/kg.

Phương pháp kết tủa bằng ethanol cũng rất đắt tiền vì do dịch chiết quá loãng, lượng ethanol tiêu tốn sẽ lớn và năng lượng sau đó dùng thu hồi ethanol cũng rất lớn.

Phương pháp làm đông có tính kinh tế tốt hơn và thực sự đã được áp dụng qua nhiều thế kỉ. Theo phương pháp này năng lượng cấp đông nhỏ hơn nhiều so với hai hương pháp trên. Gel agar được làm đông chậm để các tinh thể nước đá được tạo thành và tách ra khỏi các phân tử agar. Khi đó agar tạo thành các phiến mỏng. Nếu làm đông nhanh sẽ tạo thành các khối bọt xốp và agar không tinh khiết như khi làm đông chậm vì các tạp chất không di chuyển hết từ gel ra khu vực nước.

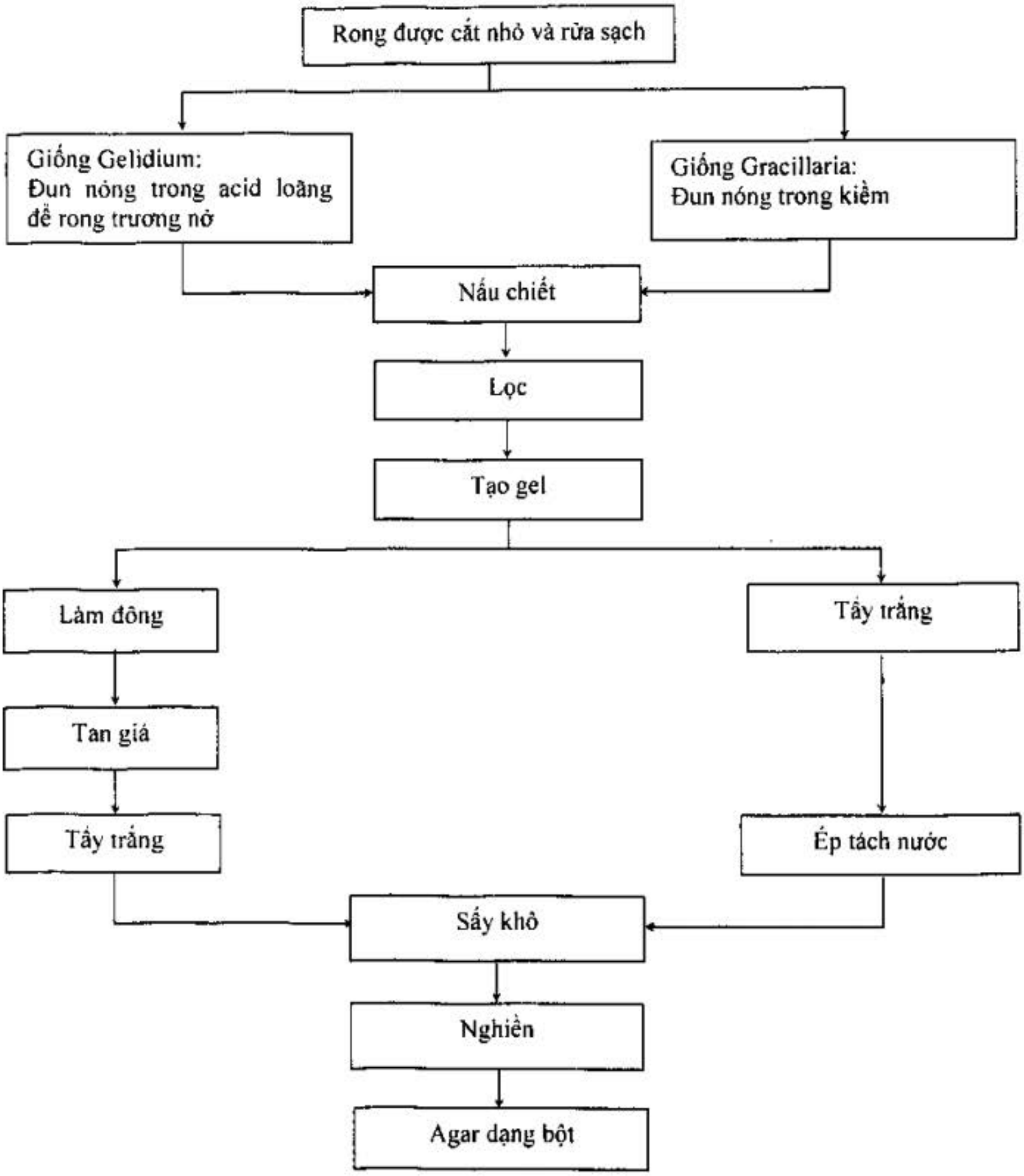
Phương pháp ép (Syneresis)

Đây là phương pháp hiện đại dùng để tách nước. Mặc dù tiêu tốn năng lượng rất ít so với các phương pháp trên nhưng cần thiết bị hiện đại. Nguyên lí của phương pháp là ép cho gel co lại và làm cho nước thoát ra khỏi mạng lưới gel. Cần phải ép với tốc độ chậm để nước thoát ra khỏi gel (syneresis) mà không làm vỡ khối gel và làm gel bị thoát ra khỏi thiết bị. Do đó lực ép cần được kiểm soát rất cẩn thận.

Theo phương pháp này, các khối gel được bọc vào vải bố, đặt trong các hộp kim loại chồng lên nhau và khớp với đầu ép thuỷ lực. Quá trình ép tiến hành rất chậm và cẩn thận. Hiện nay có một số nhà máy thiết kế các máy ép tự động cho phép ép nhanh hơn và hiệu quả hơn.

Sau khi ép tách nước, agar được sấy khô, nghiền và đóng gói.

Chất lượng agar yêu cầu là độ ẩm dưới 18%, độ tro dưới 5%, sức đông 750 g/cm^2, vi sinh tổng số dưới 10^4/g, E.coli và Salmonella không có, Pb nhỏ hơn 5ppm, As nhỏ hơn 3 ppm.



Hình 4.6 Sơ đồ sản xuất agar (Armisen và Galatas, 1997)

5. Ứng dụng

Agar là loại keo rong biển được dùng làm thực phẩm sớm nhất. Các ứng dụng của agar dựa trên các tính chất của nó đã được mô tả ở trên. Agar được cơ quan Quản lí thực phẩm và dược phẩm Hoa Kì, FDA xếp vào loại thực phẩm an toàn (GRAS, Generalli Recognised as Safe) và được FAO/WHO Codex Alimentarius cho phép dùng trong công nghiệp thực phẩm.

Trong công nghiệp thực phẩm, agar dùng làm tác nhân tạo gel, chất ổn định và tạo độ nhớt. Nó được dùng như chất phụ gia chứ không phải chất dinh dưỡng. Agar thường dùng với lượng rất nhỏ trong thực phẩm, khoảng 1%, agar khó tiêu hoá, chỉ khoảng 10%, và lượng calori có thể bỏ qua. Do đó agar dùng làm thực phẩm ăn kiêng rất phù hợp.

Agar thường dùng trong các loại thực phẩm như jelly, kẹo, nhân kẹo, tạo độ quánh cho mứt dẻo, kẹo chocolate. Agar còn dùng trong chế biến thịt, trộn vào xúc xích để giảm chất béo. Agar dùng trong đồ hộp để tạo độ nhớt.

Trong ngành dược, agar dùng làm thuốc nhuận tràng. Ở một số nước phương tây, agar dùng trị bệnh khớp vì điều trị lâu dài có sự cải thiện đáng kể sức khỏe của bệnh nhân. Agar còn được dùng để ổn định cholesterol.

Agar được dùng nuôi cấy tế bào thực vật và vi sinh vật từ lâu. Đây là một trong những ứng dụng quan trọng của agar. Từ các mô phân sinh, người ta tạo ra các clone của các loại cây không bị nhiễm virus. Agar dùng trong các kĩ thuật đặc biệt của nông nghiệp được chuẩn bị cẩn thận để không chứa các chất gây ức chế sự phát triển tế bào. Ứng dụng này của agar ngày càng tăng vì kĩ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật ngày càng được áp dụng rộng rãi.

Agarose được áp dụng trong các kĩ thuật phân li protein trong công nghệ sinh học, phân tách các acid nucleotid, DNA trong kĩ thuật điện di, trong kĩ thuật sắc kí và nuôi cấy vi sinh vật.

Để nghiên cứu sâu xa về cơ chế của các tương tác protein-polysaccharide, một hiện tượng rất có ý nghĩa trong sinh học như phiên mã protein, tương tác kháng nguyên-kháng thể, người ta hay dùng agar như là một phân tử đa điện li mang nhiều điện tích âm để tạo thành một coacervate với một protein khác như gelatin. Một ứng dụng khác nữa của agar là tạo thành các gel hữu cơ (organogel) có nhiều ứng dụng trong công nghệ sinh học và y dược. Do đó trong những năm gần đây, các nghiên cứu cơ bản về các tương tác của agar với các polymer sinh học khác được nghiên cứu sâu xa hơn, đặc biệt là các tương tác tại các bề mặt phân pha (Boral, 2010, 2012; Spandagos, 2012).

CHƯƠNG 5

ALGINAT

1. Sơ lược lịch sử, thuật ngữ

Alginat là một polysaccharide được phát hiện lần đầu tiên do một nhà hoá học người Anh là E.C.C. Stanford vào năm 1881. Có mặt trong thành phần cấu trúc của rong nâu và trong các nang polysaccharide của vi khuẩn, alginat có phân bố rộng trong tự nhiên. Trong rong nâu, alginat có thể chiếm đến 40% khối lượng rong khô. Nó có chức năng tạo độ chắc và độ mềm mại cho cây rong. Các ứng dụng chủ yếu của alginat dựa trên tính chất tạo gel, tạo độ nhớt cho dung dịch, tạo ổn định và khả năng giữ nước. Sản lượng hàng năm của alginat khoảng 30 000 tấn.

Nguồn lợi rong nâu để sản xuất alginat là các giống Ascophyllum, Durvillaea, Ecklonia, Lessonia, Laminaria, Macrocystis, Sargassum và Turbinaria. Trong đó các giống quan trọng là Macrocystis, Laminaria và Ascophyllum.

Macrocystis phân bố ven biển phía tây của Bắc Mĩ, từ miền trung California đến ven biển Baja California. Mỗi năm nước Mĩ thu hoạch khoảng 150 000 tấn và Mexico thu hoạch khoảng 30 000 tấn.

Các loài thuộc giống Laminaria có phân bố rộng từ Scotland, Na Uy, Pháp, Trung Quốc, Nhật Bản cho đến Hàn Quốc. Ở các nước Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc, rong này dùng để làm thực phẩm, do đó chỉ những loại rong nào kém phẩm chất mới dùng sản xuất alginat. Ở Trung Quốc việc trồng rong biển Laminaria japonica rất thành công. Hai loài rong khác là Laminaria hyperorea và Laminaria digitata mọc nhiều ở Pháp, Na Uy, Scotland và được khai thác để sản xuất alginat.

Loài Ascophyllum mọc ở Scotland và Ireland và được khai thác hơn một thế kỉ nay.

Sargassum và Turbinaria được khai thác ở Ấn Độ, Philippines và Việt Nam. Các loài rong này cho alginat có độ nhớt thấp và màu tối nên được dùng làm nguồn nguyên liệu thay thế khi thiếu hụt các loài rong trên. Tuy vậy alginat từ các rong này có tỉ lệ M/G thấp và do đó khả năng tạo gel rất tốt.

Macrocystis pyrifera

Laminaria japonica

Rong mơ Sargassum

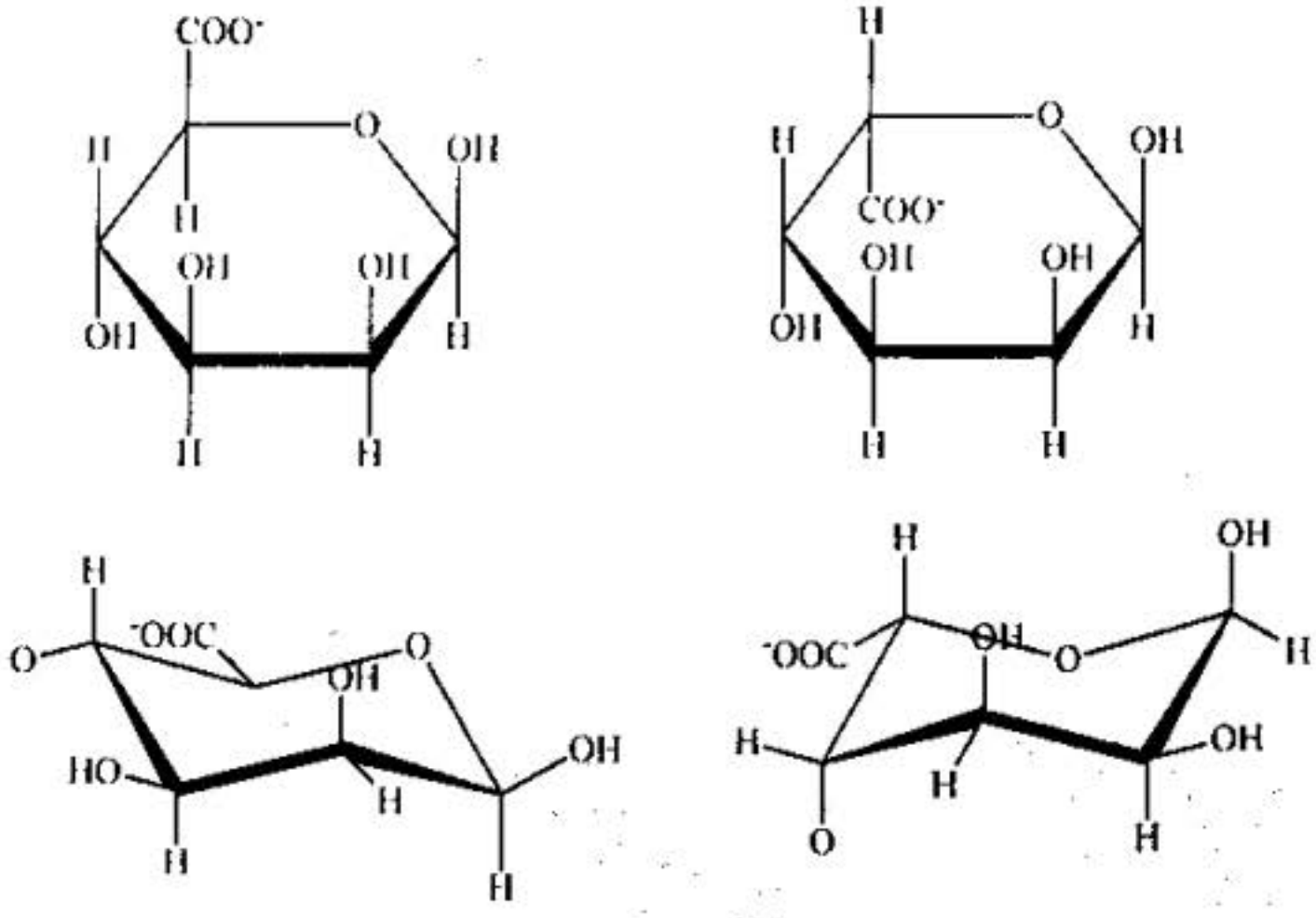
Hình 5.1 Một số loài rong dùng sản xuất alginat

2. Cấu trúc hoá học

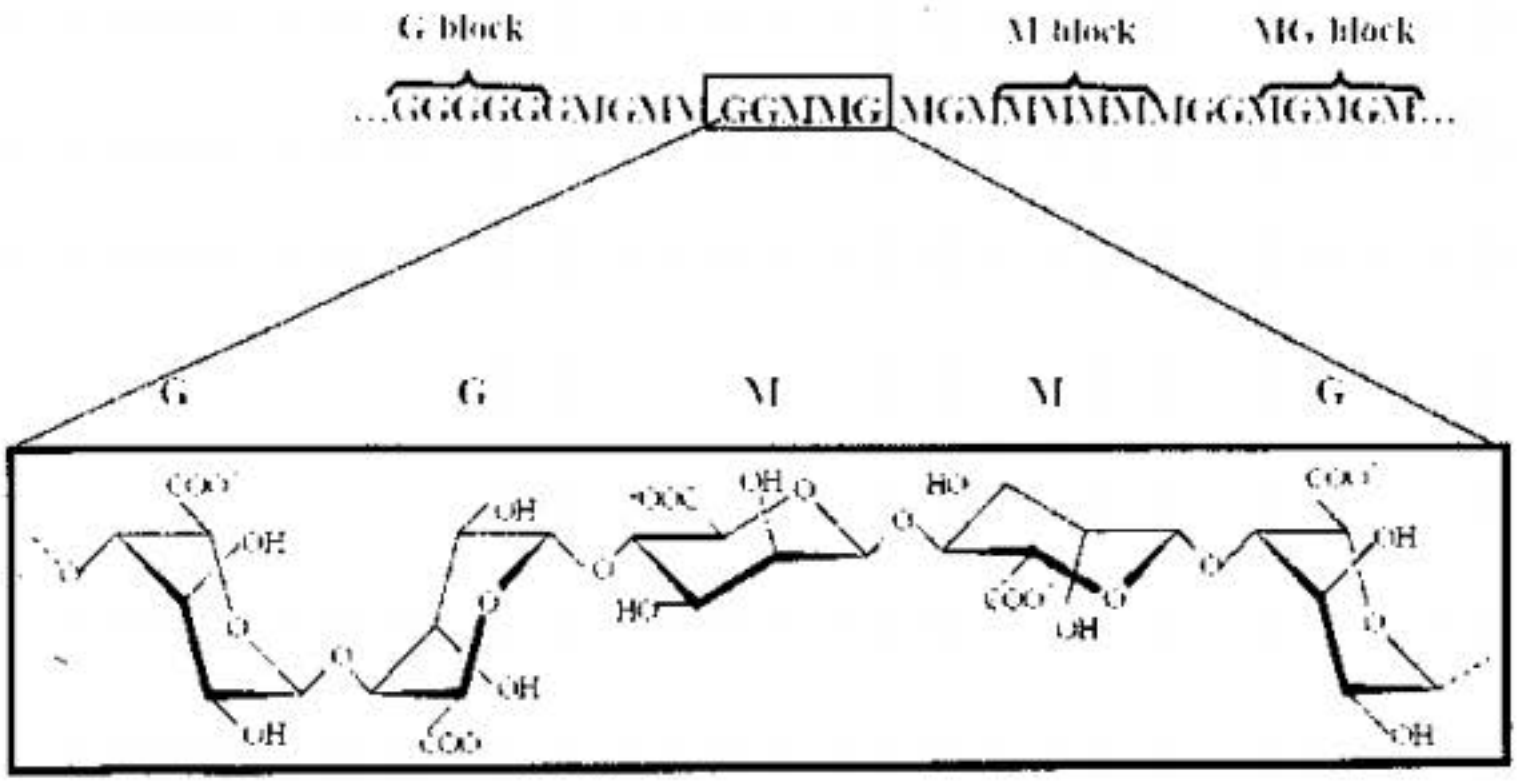
Alginat là họ của các co-polymer không phân nhánh được tạo bởi các liên kết (1,4) của acid α-L-gulopyranuronic (gốc G) và acid β-D-mannopyranuronic (gốc M). Hai acid này có cấu hình dạng ghế trong đó gốc M có cấu hình $^4C_1$ và gốc G có cấu hình $^1C_4$. Tỉ lệ của hai loại acid này, trình tự và sự phân bố của chúng thay đổi rất rộng tuỳ theo nguồn gốc của alginat.

Alginat thuộc loại co-polymer block, nghĩa là cấu trúc của nó gồm các khối khác nhau. Có ba khối là khối –MMMM-, khối –GGGG- và khối –MGMG-. Độ dài trung bình của các khối, trình tự của chúng trong mạch phân tử thay đổi tuỳ theo nguồn gốc alginat. Do cấu trúc của các gốc G và M khác nhau nên hình dạng của các khối cũng khác nhau. Khối MMMM có cấu tạo ít gấp khúc và tạo nên sự mềm mại của mạch phân tử, khối GGGG gấp khúc mạnh hơn và có độ bền chặt hơn. Các tính chất đó quyết định độ bền gel sau này của phân tử alginat. Do hai gốc G ở gần nhau hơn, liên kết giữa chúng mạnh hơn là giữa hai gốc M. Do đó liên kết GG bền hơn GM và cuối cùng là MM.

Khi đặc trưng cấu trúc phân tử alginat, người ta dùng các đại lượng tỉ lệ mole M/G, tần suất xuất hiện các khúc đôi (diad) MM, MG, GM, GG, các khúc ba (triad) MMM, MMG, MGM, GMM, GGG, GGM, GMG, MGG. Các đại lượng đó được đo trên phổ carbon ^{13}C và ^1H. Từ đó người ta tính được chiều dài trung bình của các khối.



Công thức cấu tạo của hai gốc mannuronic (M) và guluronic (G) trong phân tử alginat



Hình 5.2 Công thức cấu tạo của mannuronic và guluronic, và cấu tạo một đoạn mạch phân tử alginat với các khối MMMM, GGGG, MGMG

Bảng 5.1 Thành phần các gốc uronat trong phân tử alginate từ một số loài rong khác nhau (Smidsrod và Draget 1996)

Nguồn rong	F_G	F_M	F_{GG}	F_{MM}	$F_{MG,GM}$
Ecklonia maxima	0,45	0,55	0,22	0,32	0,32
Laminaria japonica	0,35	0,65	0,18	0,48	0,17
Laminaria digitata	0,41	0,59	0,25	0,43	0,16
Laminaria hyperborea, lá	0,55	0,45	0,38	0,28	0,17
Laminaria hyperborea, cọng	0,68	0,32	0,56	0,20	0,12
Laminaria hyperborea, vỏ ngoài	0,75	0,25	0,66	0,16	0,09
Macrocytis pyrifera	0,39	0,61	0,16	0,38	0,23

Để nghiên cứu cấu trúc alginat người ta dùng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân. Mặc dù phương pháp hoá học đã xác lập được tỉ số mole M/G nhưng không cho phép đi sâu hơn về cấu trúc. Phương pháp NMR áp dụng cho alginat được Penman nghiên cứu lần đầu tiên (Penman, 1972) và sau đó được Grasdalen hoàn thiện (Grasdalen, 1977, 1978, 1979,1981, 1983). Việc thu phổ toàn phần của alginat khá khó khăn vì alginat tạo dung dịch có độ

nhớt cao trong nước. Do đó phải thuỷ phân để giảm độ polymer hoá DP làm cho các phân tử linh động hơn. Mặt khác sự có mặt của các ion kim loại trong dung dịch cũng làm cho các phân tử tạo liên kết và kém linh động, cần cho tác nhân EDTA để bắt giữ các ion đó, đồng thời phải tăng nhiệt độ lên. Do hàm lượng carbon ^{13}C trong tự nhiên rất ít, chỉ khoảng 1,108%, cần phải dùng số lần scan từ 20 000 đến 40 000 mới thu được phổ tốt.

Trên phổ toàn phần của alginat, carbon anome sẽ bị tách mũi do ảnh hưởng của các gốc lân cận. Tuỳ theo độ phân giải của thiết bị NMR, nó có thể tách thành 4 mũi thể hiện tần suất xuất hiện của 4 diad là F_{MM}, F_{GM}, F_{MG}, F_{GG} hay tách thành 8 mũi, thể hiện 8 triad F_{MMM}, F_{MMG}, F_{MGM}, F_{GMM}, F_{GGG}, F_{GGM}, F_{GMG}, F_{MGG}.

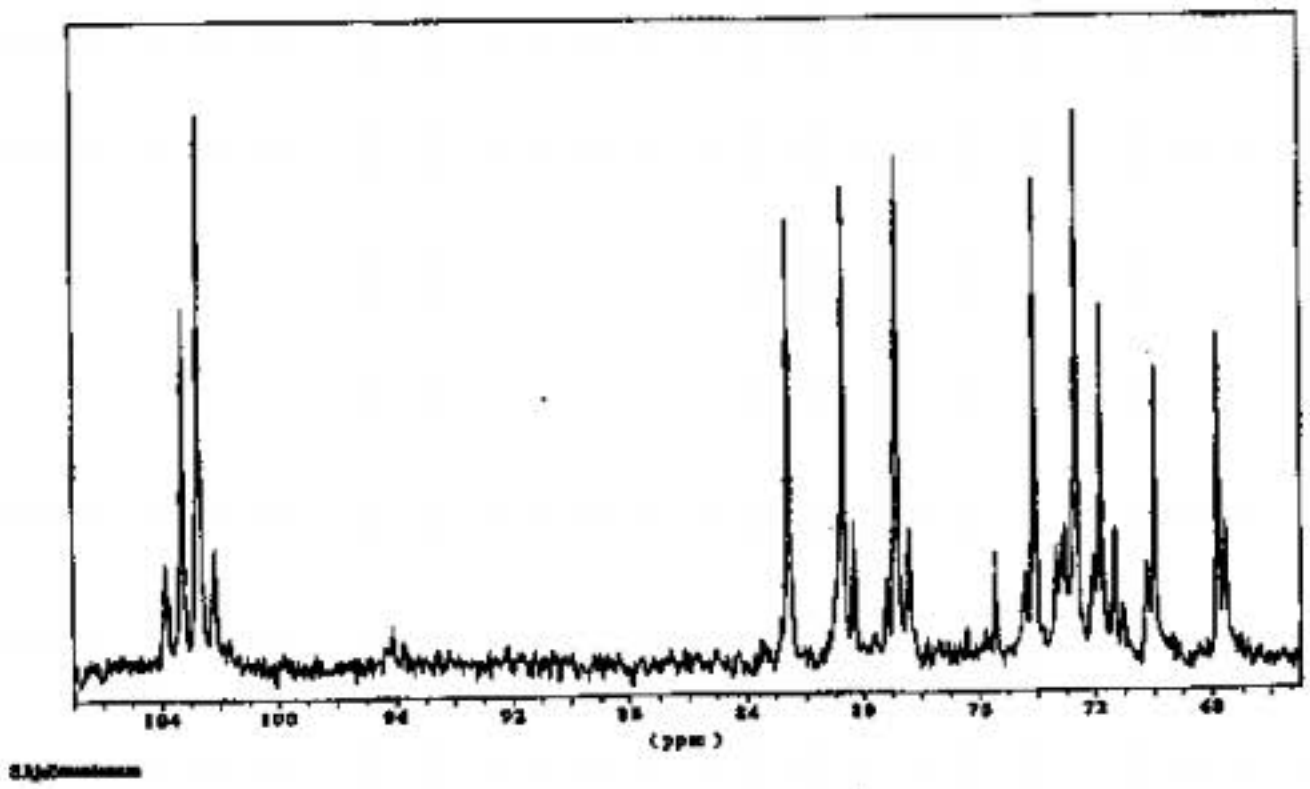
Bảng 5.2 Độ dịch chuyển hoá học của alginat trên phổ ^{13}C từ các nguồn alginat khác nhau (Nghĩa, 1996).

Vị trí cacbon	polymannuronat			polyguluronat		
	A	B	C	A	B	C
C1	102,8	102,3	102,4	103,3	103,5	103,5
C2	72,2	72,7	72,2	67,8	67,2	67,5
C3	74,1	73,9	74	71,8	71,4	71,6
C4	80,7	80	80,1	82,6	82,2	82,8
C5	78,9	78,3	78,3	69,9	69,6	69,6
C6	177,1	177,9	177,9	177,6	178	178

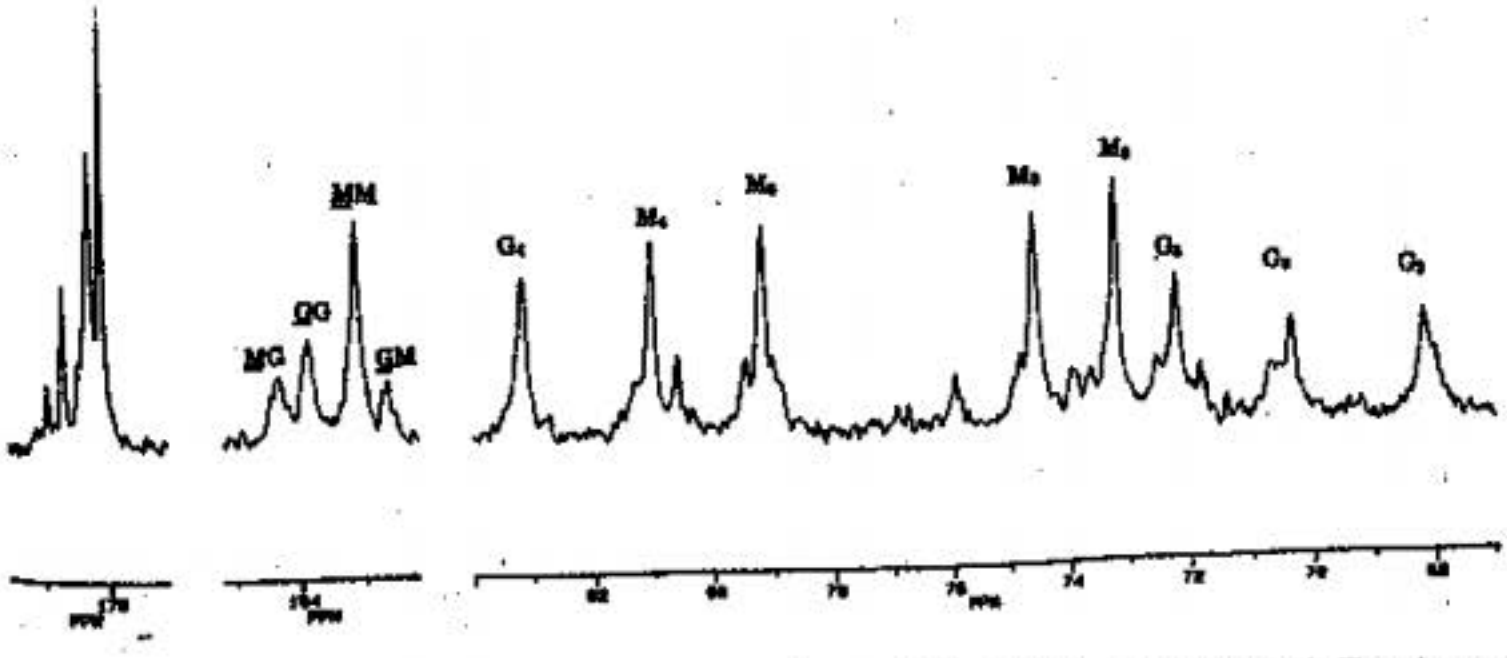
A: Grasdalen (1977)

B: Alginat của công ty Aldrich

C: Alginat từ *S.mcclurei* (Nghĩa,1996)



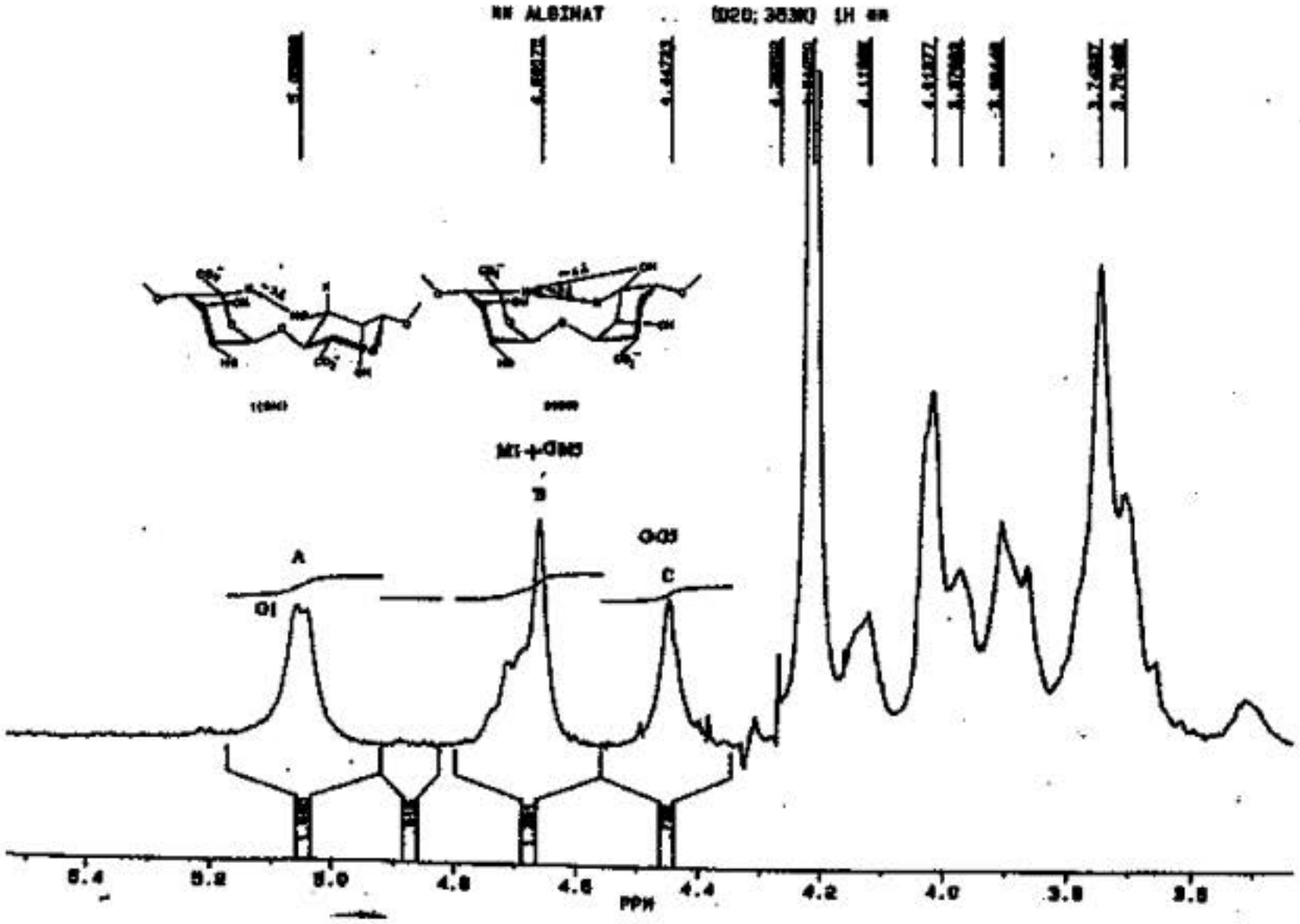
Hình 5.3 Phổ ^{13}C NMR của alginat tách chiết từ rong mơ S.kjellmanianum (Nghĩa, 1999)



Hình 5.4 Phổ NMR ^{13}C của alginat của carbon C1 và C5, máy NMR Bruker 400 MHz (Nghĩa, 1999)

Mặc dù phổ ^{13}C cho thông tin trực tiếp về cấu trúc alginat. việc thu phổ của nó gặp nhiều khó khăn. Để thuận lợi hơn, người ta dùng phổ proton ^{1}H. Ở đây cũng cần tăng nhiệt độ chạy phổ nhưng khác với phổ ^{13}C, đối với phổ proton, nhiệt độ tăng làm dịch chuyển mũi HOD về phía trường cao để làm lộ ra 3 mũi cần thiết dùng định lượng cấu trúc alginat. Ba mũi đó được kí hiệu A, B và C với độ dịch chuyển hoá học tương ứng là 5,05 ppm, 4,7 ppm và 4,45 ppm. Mũi A tương ứng với cộng hưởng H-1 của gốc G, mũi B tương ứng H-1 của M và H-5 của GM, mũi C tương ứng H-5 của GG. Gọi diện tích của 3 mũi đó là I_a, I_b và I_c, ta có các công thức sau (Grasdalen, 1983)

$$F_G = I_a / (I_b + I_c)$$
$$F_M + F_G = 1$$
$$F_{GG} = I_c / (I_b + I_c) \qquad (5.1)$$
$$F_{GG} + F_{GM} = F_G$$
$$F_{MM} + F_{MG} = F_M$$
$$F_{MG} = F_{GM}$$



Hình 5.5 Phổ proton của alginat từ rong mơ Sargassum, (Nghĩa, 1999)

Bảng 5.3 Thành phần mol M/G và các tần suất diad của alginat chiết từ rong mơ Sargassum. Máy NMR Bruker 200 MHz (Nghĩa, 1996).

Nguồn gốc alginat	F_M	F_G	F_{MG} F_{GM}	F_{GG}	F_{MM}	M/G	$\bar{N}_M$	$\bar{N}_G$
S.mcclurei	0.54	0,46	0,1	0.36	0,44	1,2	5,4	4,6
-Lá rong	0.67	0.33	0.07	0.26	0.60	2.00	9.57	3.71
-Thân rong	0.52	0.48	0.10	0.38	0.42	1.08	5.2	3.8
S.polycystum	0.51	0.49	0.08	0.41	0.43	1.04	6.37	6.12
S.kjellmanianum	0.56	0.44	0.11	0.33	0.45	1.27	5.09	4.0

Để tính chiều dài trung bình của các khối polyM và polyG, người ta dùng công thức sau:

$$\bar{N}_M = F_M / F_{MG}$$

$$\bar{N}_G = F_G / F_{GM} \qquad (5.2)$$

3. Tính chất

a) Độ nhớt

Do phân tử alginat có nhiều gốc OH, khi tan vào nước, các liên kết hydro sẽ làm cho dung dịch có độ nhớt. Phân tử alginat càng dài, liên kết càng nhiều và do đó độ nhớt càng lớn với cùng nồng độ. Dung dịch alginat là một dung dịch phi Newton, có nghĩa là độ nhớt của dung dịch thay đổi theo tốc độ trượt. Khi nhiệt độ tăng, độ nhớt sẽ giảm.

Một trong những tính chất quan trọng của alginat làm nên nhiều ứng dụng của nó là tạo dung dịch nước có độ nhớt cao dù chỉ với một hàm lượng nhỏ. Khi hoà tan alginat natri vào nước, ta thu được một chất lỏng phi Newton. Các nghiên cứu cho thấy dung dịch alginat trong nước thuộc loại chất lỏng pseudoplastic, tức là khi tăng tốc độ trượt thì độ nhớt giảm đi. Điều này cho thấy các phân tử alginat có sự định hướng theo chiều dòng chảy và giảm lực ma sát giữa chúng và chất lỏng. Mặt khác, khi tác động ứng suất không đổi theo thời gian, độ nhớt dung dịch alginat giảm xuống. Điều này có nghĩa là dung dịch alginat có tính chất thixotropy. Các tính chất này được nghiên cứu trên nhớt kế rotor. Độ nhớt dung dịch alginat chịu ảnh hưởng bởi các nhân tố chính là khối lượng phân tử, nồng độ alginat trong dung dịch, nhiệt độ, độ pH và sự có mặt của các cation trong dung dịch.

b) Khối lượng phân tử

Alginat là một polymer đa phân tán với chỉ số phân tán $\bar{M}_w/\bar{M}_n$ nằm trong khoảng 1,4 đến 1,6, chỉ số này có liên quan đến loài rong và phương pháp tách chiết.

Khối lượng phân tử càng cao, độ nhớt dung dịch alginat càng lớn. Các nhà sản xuất có thể khống chế khối lượng phân tử qua các điều kiện tách chiết như nhiệt độ và thời gian chiết để có độ nhớt nằm trong dải từ 10 – 1000 mPa.s (dung dịch 1%) tương ứng với DP từ 100 đến 1000 đơn vị. Dung dịch alginat có độ nhớt 200 – 400 mPa.s là loại trung bình có ứng dụng rộng rãi nhất.

c) Nồng độ

Mc Dowell (1960, 1977) đưa ra phương trình kinh nghiệm về quan hệ giữa độ nhớt dung dịch alginat η và nồng độ C như sau:

$$\log_{10}\eta = a(C-b)^{0.5} \qquad (5.3)$$

Trong đó a là hằng số liên quan đến DP của alginat, b liên quan đến loại alginat.

d) Nhiệt độ

Khi nhiệt độ tăng, độ nhớt dung dịch giảm với tốc độ 2,5% trên một độ Celsius. Khi làm lạnh trở lại , độ nhớt quay lại gần bằng giá trị ban đầu. Nếu duy trì nhiệt độ cao trên 50^0C trong thời gian đủ lâu, sự thuỷ phân sẽ xảy ra và làm giảm độ nhớt vĩnh viễn.

Dung dịch alginat có thể được làm đông và tan giá nhiều lần mà không làm thay đổi độ nhớt. Nhưng nếu có mặt của ion canxi trên 0,5%, độ nhớt sẽ tăng và có thể tạo gel. Khi đó các thay đổi do làm đông và tan giá sẽ không thuận nghịch.

e) Độ pH

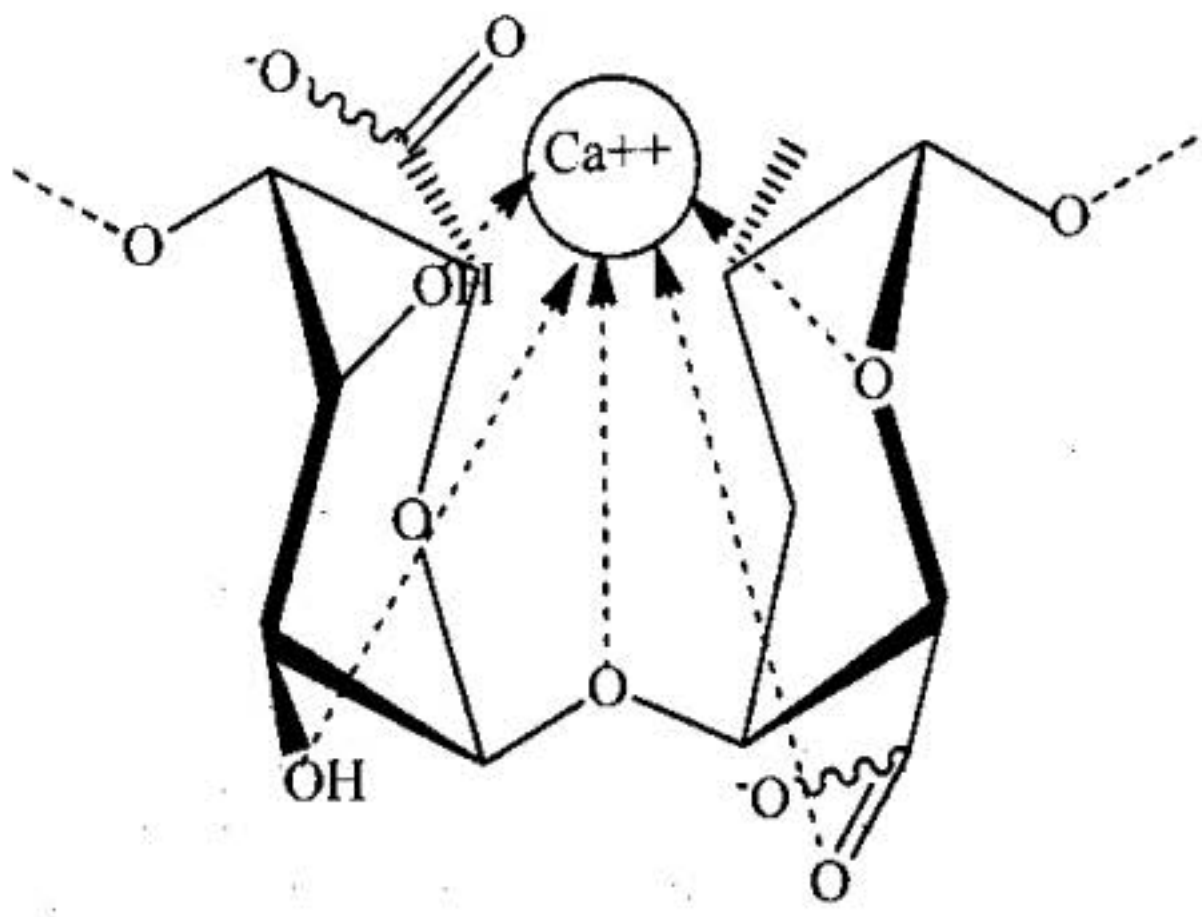
Độ nhớt của dung dịch alginat không bị ảnh hưởng khi pH biến thiên từ 5-11. Khi pH dưới 5, các ion $-COO^-$ trong mạch phân tử sẽ bị proton hoá nghĩa là liên kết với hydro thành –COOH làm cho lực đẩy tĩnh điện giữa các mạch phân tử bị giảm. Các phân tử sẽ tiến lại gần nhau và tạo liên kết hydro, từ đó làm tăng độ nhớt của dung dịch. Khi pH giảm nhiều hơn nữa, các phân tử sẽ liên kết tạo thành gel với pH trong khoảng 3-4. Nếu trong dung dịch có mặt ion canxi, sự tạo gel có thể xảy ra ở pH bằng 5. Nếu pH giảm nhanh từ 6 xuống 2, sự kết tủa gel của acid alginic hình thành. Khi pH lớn hơn 11, hiện tượng depolymer hoá sẽ xảy ra chậm chạp và làm giảm độ nhớt.

f) Ion canxi

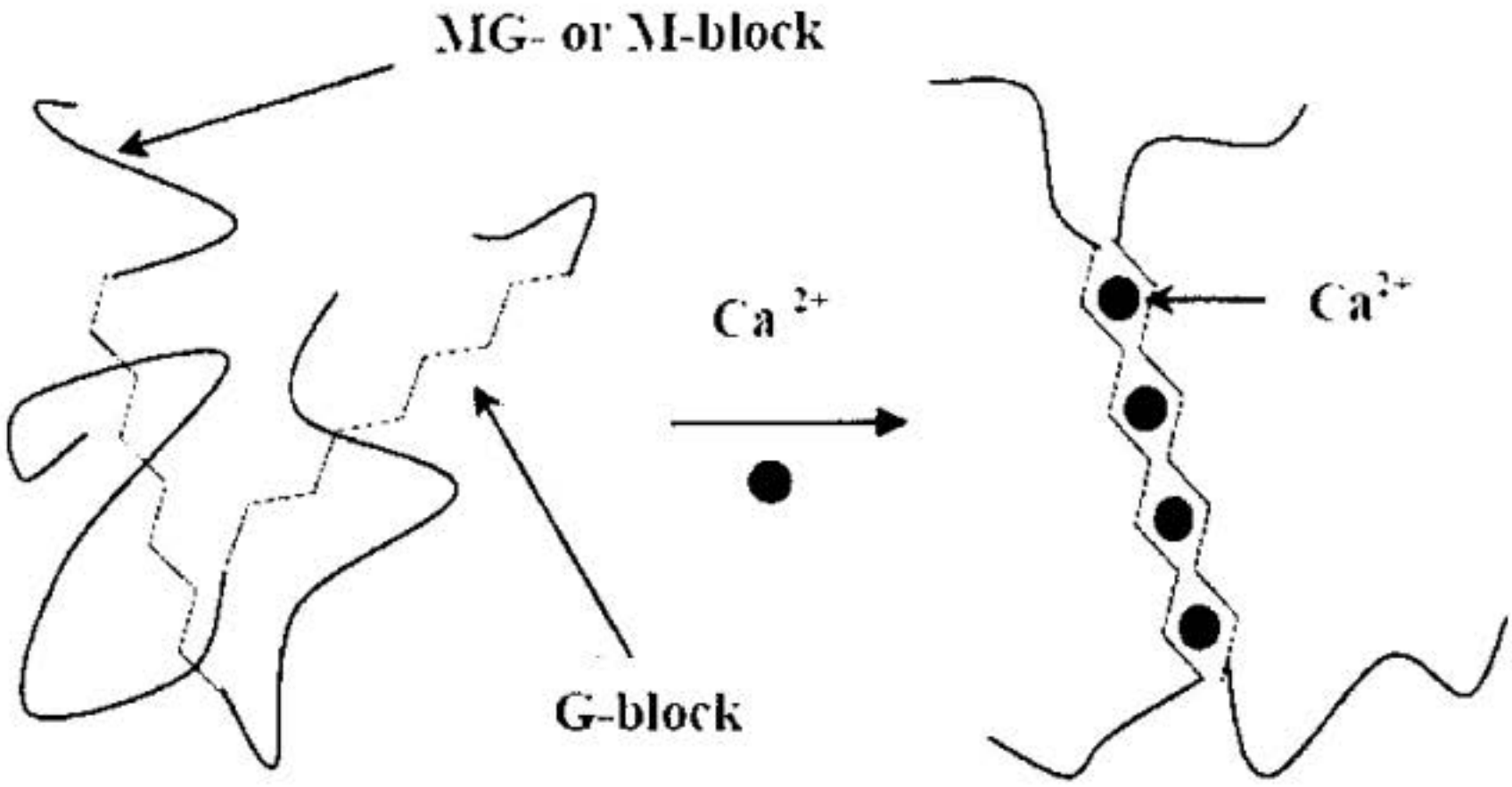
Sự có mặt của ion canxi với nồng độ thấp sẽ làm tăng độ nhớt dung dịch alginat đáng kể do sự tạo thành gel. Điều này cho phép tăng độ nhớt dung dịch mà không cần tăng khối lượng phân tử alginat hay tăng nồng độ alginat. Tuy nhiên nhược điểm của phương pháp này là khi khuấy trộn, gel sẽ bị phá huỷ và do đó giảm độ nhớt đi nhiều hơn là dung dịch alginat không có canxi.

g) Khả năng tạo gel

Do cấu trúc phân tử bao gồm các block khác nhau nên khi cho vào dung dịch có chứa các ion hoá trị hai, alginat sẽ tạo liên kết giữa các chuỗi phân tử do các cầu nối là các ion. Để giải thích điều này, có hai vấn đề cần làm rõ. Thứ nhất mạng lưới gel được tạo thành khi có vùng nối và vùng ngắt giữa các phân tử. Thứ hai là các ion tạo được liên kết ngang giữa các phân tử. Phân tử alginat thoả hai điều này. Các khối GGGG tạo các hốc vừa với nhiều ion hoá trị hai như Ca^{2+}, Ba^{2+}, Sr^{2+}, ...và khi đó hai chuỗi chồng lên nhau như vỉ trứng với các quả trứng là các ion. Các vùng chứa khối MMMM và GMGM không tham trực tiếp liên kết với các ion sẽ tạo ra các vùng ngắt. Do đó mạng lưới gel vừa có độ bền chắc, vừa có độ mềm dẻo. Trong các ion thì ion Ca^{2+} có kích thước vừa với hốc tạo bởi 4 gốc G từ hai chuỗi phân tử alginat khác nhau. Mô hình đó gọi là mô hình vỉ trứng (Egg-box). Các liên kết từ các nguyên tử oxy có độ âm điện cao với ion Ca^{2+} được mô tả trên hình vẽ.



Hình 5.6 Liên kết hoá học giữa ion canxi với các gốc guluronic



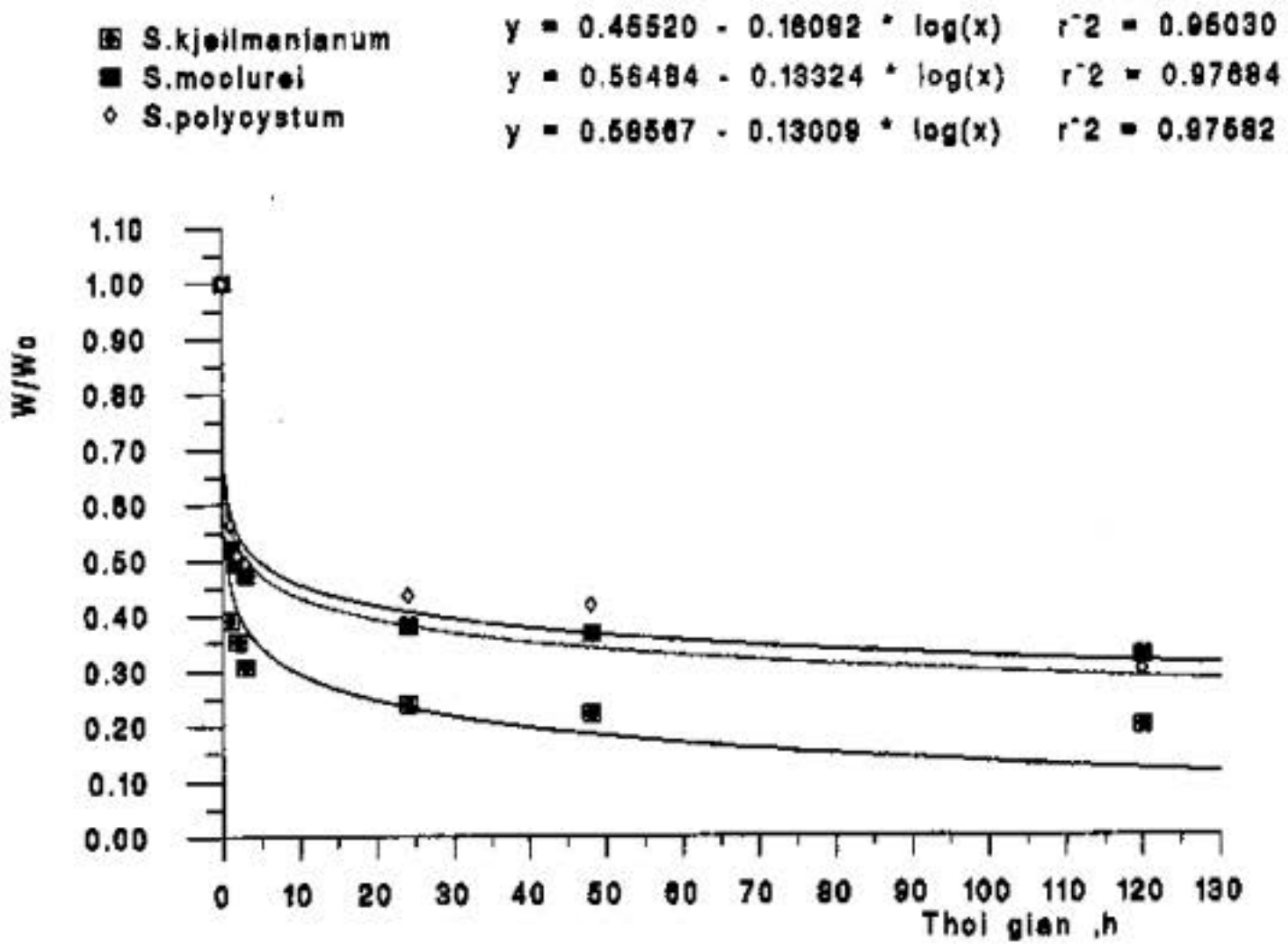
Hình 5.7 Sự tạo gel alginat canxi theo mô hình vỉ trứng

Các gel của alginat với các ion hoá trị hai như Ca^{2+}, Sr^{2+} hay Ba^{2+} được tạo ra ở nhiệt độ phòng và không bị chảy khi đun nóng đến 100^0C, trong đó gel với Ba^{2+} và Sr^{2+} mạnh hơn gel Ca^{2+}. Tính chất này có nhiều ứng dụng trong công nghiệp. Đặc biệt là gel alginat canxi có rất nhiều ứng dụng vì muối rẻ tiền, sẵn có và không độc. Các cation hoá trị một và Mg^{2+} không tạo gel. Các ion Pb^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} và Mn^{2+} cũng tạo gel nhưng ít dùng vì độc tính của các ion đó.

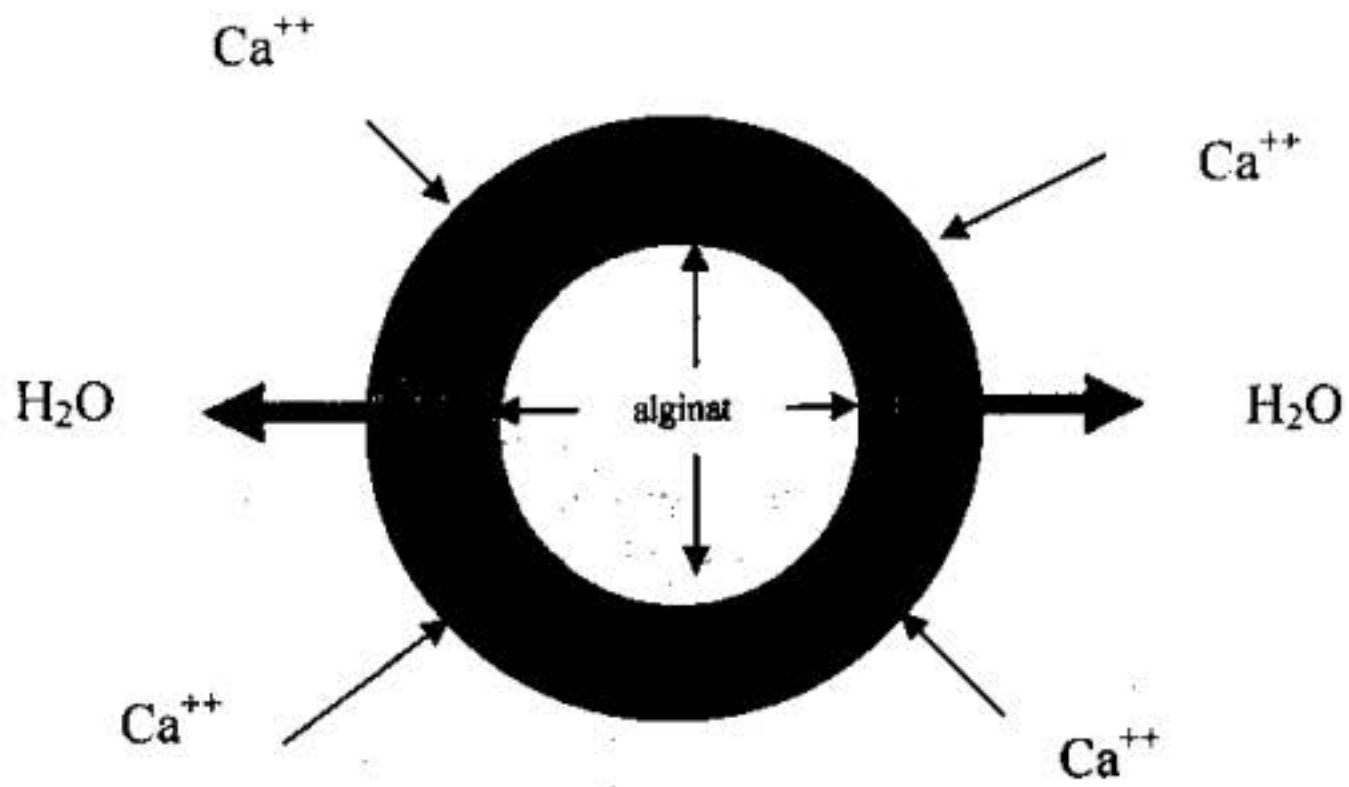
Khi tạo gel người ta thường đổ dung dịch alginat vào dung dịch chứa ion canxi. Trong các ứng dụng, thường gel tạo thành có dạng sợi hoặc hình cầu. Để hiểu rõ quá trình tạo gel, ta xét quá trình tạo hạt gel hình cầu có rất nhiều ứng dụng.

Khi một giọt dung dịch alginat natri rơi vào dung dịch chứa ion Ca^{2+}, quá trình tạo gel lập tức xảy ra. Các ion Ca^{2+} đi vào bề mặt ranh giới của giọt dung dịch alginat và hình thành các lớp gel đầu tiên ở bề mặt. Theo mô hình vỉ trứng, các phân tử alginat bên trong giọt dung dịch sẽ di chuyển ra bề mặt là nơi có nồng độ ion Ca^{2+} nhiều và chồng chất lên nhau theo mô hình vỉ trứng. Do đó lớp gel ở bề mặt hạt gel sẽ có bề dày và độ chắc hơn lớp bên trong. Khi đó ở vùng trung tâm của hạt gel sẽ có nồng độ alginat rất thấp và chứa đầy nước. Hạt gel tạo thành một lớp vỏ dày bên ngoài. Gel như thế gọi là gel dị thể. Khi cắt nhanh hạt gel, ta sẽ thấy nó rỗng và chứa nước ở trung tâm. Trong quá trình tạo gel, hạt gel bị co rút và nước thoát ra ngoài, do đó

khối lượng của nó bị giảm. Alginat từ các loài rong khác nhau sẽ có độ co rút khác nhau khi tạo gel do hàm lượng guluronic khác nhau.



Hình 5.8 Sự co rút hạt gel trong quá trình tạo gel của alginat từ các loài rong khác nhau với F_{GG} của 3 loại alginat từ các rong S.polycystum, S.mmclurei, S.kjellmanianum lần lượt là 0,41; 0,36; 0,33. (Nghĩa, 1997)



Hình 5.9 Quá trình hình thành hạt gel alginat

Để tạo gel đồng thể người ta dùng một loại muối chứa canxi có độ hoà tan thấp để giải phóng ion canxi chậm như citrat canxi. Như vậy quá trình tạo gel diễn ra chậm, ở mọi nơi và tạo gel đồng thể. Một cách khác để tạo gel đồng thể tốt hơn là dùng một muối canxi không tan trong môi trường trung

tính nhưng tan trong pH thấp là dicalcium phosphate để cho vào dung dịch alginat natri. Sau đó thêm vào một acid có độ hoà tan thấp như acid apidic. Acid này làm cho pH giảm chậm, do đó giải phóng ion canxi từ từ. Gel được tạo thành tại nhiều nơi một lúc nên tạo ra gel đồng thể. Thời gian tạo gel có thể được điều khiển do tốc độ giải phóng ion canxi. Chú ý rằng mặt dù hạt gel được định hình rất nhanh nhưng sự tạo gel bên trong xảy ra khá chậm do có sự sắp xếp của các phân tử.

Việc tạo gel đồng thể hết sức quan trọng khi nghiên cứu tính chất lưu biến của gel alginat. Để nghiên cứu quan hệ ứng suất và biến dạng của gel alginat, cần tạo gel đồng thể.

Tương tự như vậy khi tạo sợi alginat, ta sẽ được một sợi rỗng có thành dày từ gel alginat.

Độ bền của gel alginat canxi phụ thuộc vào nồng độ alginat, loại alginat (chiết từ rong nào), DP, nồng độ ion canxi. Trong các nhân tố kể trên, loại alginat có vai trò quan trọng nhất. Như đã phân tích ở trên, khả năng tạo gel của alginat là do các khối polyguluronic –GGGG–. Như vậy loại alginat nào có nhiều khối polyG và chiều dài trung bình của nó lớn sẽ tạo thành nhiều vùng nối và do đó làm cho mạng lưới gel chắc hơn. Ngược lại, nếu chứa nhiều khối –MMMM– thì gel sẽ mềm mại hơn. Chiều dài của đoạn –MGMG– thường ngắn và không tham gia trực tiếp. Cần chú rằng không phải tất cả các ion hoá trị hai đều tạo gel với alginat. Vấn đề này phụ thuộc vào kích thước tương đối của ion và khoang tạo thành giữa các gốc G. Điều này giải thích vì sao magnesium không tạo gel.

Cần chú ý rằng mô hình vỉ trứng tạo gel trong không gian ba chiều và do đó sự sắp xếp các mạch phân tử sẽ khá phức tạp.

Các hạt gel có đường kính lớn hơn 1mm gọi là hạt gel lớn có thể tạo thành như trên khi cho alginat đi qua kim tiêm hay pipet. Trong nhiều trường hợp người ta cần tạo ra các hạt gel nhỏ (microbead) có đường kính nhỏ hơn 0,2 mm. Có ba cách để tạo hạt gel nhỏ là phun sương (dùng các atomizer trong máy sấy phun), tạo nhũ tương hoặc tạo giọt kết tụ (coacervation).

Gel acid

So với gel từ các cation, gel acid còn ít được nghiên cứu, có lẽ vì ứng dụng còn hạn chế. Do phân tử alginat có chứa nhiều nhóm carboxyl, khi pH thấp, từ 3-4, các nhóm này ($-COO^-$) sẽ bị proton hoá thành các nhóm –COOH. Kết quả là lực đẩy tĩnh điện giữa chúng giảm đi, các phân tử sẽ tiến gần nhau hơn và tạo nên nhiều các liên kết hydro do chúng chứa nhiều nhóm OH. Gel acid có độ bền bằng một nửa gel canxi, không bền nhiệt và mềm dần đi ngay cả nhiệt độ phòng vì ở pH thấp, acid alginic bị depolymer hoá.

An toàn thực phẩm

Acid alginic, propylen glycol ester alginat, alginat amonium, alginat canxi, alginat kali và alginat natri được công nhận là thực phẩm an toàn (GRAS status) và các tính chất được cho trong Food Chemical Codex. Uỷ ban Phụ gia thực phẩm (Expert Committee of Food Additives of the Food), Tổ chức Nông nghiệp của Liên Hiệp quốc (Agriculture Orgnization of UN) và Tổ chức Y tế thế giới (World Health Orgnization) khuyến cáo các lượng ăn hằng ngày chấp nhận (Acceptable Daily Intake) đối với các loại muối của acid alginic là 50 mg/kg thể trọng.ngày, đối với propylene glycol alginat là 25 mg/kg thể trọng.ngày.

4. Tách chiết

Alginat được tách chiết từ rong biển như các loài Laminaria, Macrocystis, Sargassum theo một trong hai quy trình chính là quy trình acid và quy trình canxi. Các quy trình này đều có nguyên tắc chung là chuyển alginat trong rong biển từ dạng không tan sang dạng tan trong dung dịch. Lọc sạch bã rong, tẩy trắng, sau đó chuyển alginat sang dạng không tan để lấy ra khỏi dung dịch. Các bước tiếp theo bao gồm ép tách nước, chuyển sang dạng hoà tan, sấy khô, nghiền và đóng gói.

Các quá trình đó đều là các phản ứng trao đổi ion giữa alginat và các ion.

Sau đây các quy trình được mô tả tỉ mỉ.

Quy trình alginat canxi

Công đoạn 1 : Cắt nhỏ rong nguyên liệu

Nguyên liệu là rong tươi, khô hoặc bảo quản trong các xi-lô. Loại rong được bảo quản trong các xi-lô đã được cắt nhỏ, xử lí bằng formol loãng và bảo quản trong các bồn chứa lạnh nhiều tháng. Rong khô được ngâm nước để nở ra. Việc cắt nhỏ rong có mục đích làm cho việc xử lí hoá chất sau đó dễ dàng hơn vì các hoá chất sẽ dễ thấm vào rong. Mặt khác việc cắt nhỏ rong làm cho việc vận chuyển bằng thuỷ lực dễ dàng hơn trong nhà máy.

Công đoạn 2: Xử lí acid

Trong rong nâu, alginat thường tồn tại chủ yếu ở dạng muối canxi, ngoài ra còn ở dạng muối magne và muối kali. Người ta sẽ chuyển alginat (Alg) từ các dạng muối nói trên sang dạng acid (HAlg) rồi chuyển tiếp sang dạng muối natri hoà tan. Phương trình phản ứng như sau:

$$Ca(Alg)_2 + 2H+ \rightarrow 2HAlg + Ca^{++}$$
$$HAlg + Na^{+} \rightarrow NaAlg + H^{+}$$

Việc chuyển hai bước có vẻ như hơi dài dòng nhưng lại cho hiệu suất tốt hơn là chuyển thẳng từ dạng canxi sang dạng muối natri. Mặt khác khi ngâm

acid, các hợp chất phenol hoà tan trong acid sẽ được loại bỏ phần lớn. Các hợp chất phenol sẽ làm cho sản phẩm sau này có màu nâu tối và làm giảm độ nhớt của alginat trong quá trình chiết.

Trong thực tế, người ta thường dùng acid sulfuric 0,1M hoặc acid HCl để ngâm rong trong 30 phút có khuấy đảo. Sau đó dùng máy lọc trống quay để thu hồi rong.

Công đoạn 3: Xử lí formol

Thực tế cho thấy công đoạn xử lí acid không loại bỏ hoàn toàn các hợp chất phenol và làm cho sản phẩm có màu nâu, đặc biệt là đối với các loài rong nhiệt đới như Sargassum, do đó cần có công đoạn ngâm formol. Phản ứng giữa formol và các hợp chất phenol tạo thành các hợp chất không tan và nằm lại trong cây rong khi tách chiết.

Người ta thường dùng formol nồng độ 0,1-0,4% ở nhiệt độ phòng để xử lí. Nồng độ và thời gian ngâm phụ thuộc loại rong và hàm lượng hợp chất phenol chứa trong rong. Đối với các loài rong Laminaria không cần ngâm lâu nhưng rong Sargassum thì cần thời gian và nồng độ formol lớn hơn. Cần chú ý rằng formol là chất độc, do đó hiện nay, người ta dần dần loại bỏ công đoạn này trong các sản phẩm alginat dùng trong thực phẩm.

Công đoạn 4: Chiết bằng kiềm

Như đã nói trên, mục đích của công đoạn này là chuyển alginat từ dạng acid sang dạng muối natri hoà tan vào dung dịch để tách nó ra khỏi rong. Ngoài mục đích chính là tách chiết với hiệu suất cao, công đoạn này còn được dùng để kiểm soát độ nhớt của sản phẩm như mong muốn. Nhiệt độ cao và thời gian kéo dài sẽ bẻ gãy mạch của acid alginic và làm giảm độ nhớt. Để thu được alginat có độ nhớt cao, người ta có thể chiết ở nhiệt độ phòng với thời gian kéo dài. Khi cần đạt được các mục tiêu về hiệu suất, khối lượng phân tử như mong muốn, cần thiết kế thí nghiệm tối ưu và tiến hành sản xuất thử với mỗi loại rong khác nhau.

Quá trình nấu chiết được thực hiện trong nồi nấu với hàm lượng carbonat natri (soda) khoảng 1,5% ở nhiệt độ từ 50-95^{0}C trong 1-2 giờ. Dịch chiết trong quá trình nấu sẽ có độ nhớt tăng lên do alginat tan ra ngày càng nhiều.

Công đoạn 5: Tách bã rong

Sau khi nấu, ta sẽ thu được dịch chiết có dạng lỏng quánh và chứa các bã rong nhỏ, mịn và nhớt. Các bã rong này sẽ mau chóng làm tắc vải lọc. Do đó để tách bã rong người ta dùng quá trình kết bông và tuyển nổi. Để các đám bông dễ nổi lên, cần giảm độ nhớt dung dịch. Vì vậy, dịch chiết được pha loãng bằng nước để giảm độ nhớt xuống dưới 100 cps. Sau đó người ta thêm các chất tạo kết bông, sục khí và để yên trong vài giờ. Vì bã rong bản

chất là cellulose mang điện tích âm. các chất tạo kết bông được dùng là các chất có điện tích dương. thường dùng polyacrylamide. Các bọt khí sẽ bám vào các khối bông tạo thành và làm cho nó nổi lên bề mặt dịch chiết. Lớp bông nổi lên đó sẽ được gạt ra khỏi bình và thu hồi còn dịch trong được thải ra từ phía dưới. Phương pháp này rất kinh tế và dễ thực hiện so với lọc bằng chất trợ lọc. Nếu cần độ trong tốt hơn nữa, người ta sẽ lọc lại lần thứ hai.

Người ta còn dùng máy li tâm để tách bã nhưng sản phẩm không tốt bằng và máy li tâm tiêu thụ nhiều năng lượng do phải xử lí một lượng dịch có thể tích lớn sau khi pha loãng.

Công đoạn 6: Kết tủa alginat canxi

Để tách alginat ra khỏi dung dịch, cần phải chuyển nó sang dạng không tan. Theo quy trình canxi, người ta chuyển alginat natri trong dung dịch sang dạng alginat canxi. Quá trình này được tiến hành bằng cách đổ cẩn thận dung dịch alginat natri vào dung dịch clorua canxi $CaCl_2$ 10%. Các sợi alginat canxi được tạo thành, thu hồi bằng lưới lọc và rửa sạch bằng nước. Chú ý không được đổ ngược lại, sẽ tạo thành một khối gel và khó tách nước.

Công đoạn 7: Tẩy trắng

Tuỳ theo loại rong và yêu cầu của sản phẩm cuối cùng, alginat cần được tẩy trắng. Thường dùng dung dịch hypochlorite sodium (nước javel) nồng độ 12% thêm vào alginat canxi nằm trong nước. Lượng dung dịch javel và thời gian ngâm tuỳ trường hợp cụ thể. Sau đó alginat canxi được tách ra bằng lưới lọc.

Công đoạn 8: Chuyển alginat canxi sang dạng acid alginic

Mục đích của công đoạn này là chuyển alginat canxi sang dạng acid để dễ tách nước. Người ta tiến hành bằng cách khuấy các sợi alginat canxi trong dung dịch acid HCl loãng có pH = 2. Công đoạn này thường được tiến hành theo ba bước để phản ứng được triệt để.

Công đoạn 9: Loại nước khỏi acid alginic

Công đoạn này được tiến hành trong máy ép vít cho đến khi độ khô của sản phẩm là 25%. Việc ép ở dạng sợi này dễ hơn là acid alginic ở thể gel trong quy trình acid alginic.

Công đoạn 10: Chuyển acid alginic sang dạng alginat natri

Acid alginic sau khi loại nước có độ khô 25% được cho vào máy trộn và thêm vào bột soda. Khi đảo trộn, alginat natri thu được do hàm lượng cao sẽ tạo thành dạng nhão (paste) đặc quánh và do đó cần dùng máy trộn chuyên cho các dạng paste có độ quánh cao. Quá trình này còn được gọi là quá trình trung hoà. Phản ứng có thể tiến hành ở nhiệt độ đến 50^0C nếu cần. Sau đó

dạng paste được cho vào máy ép đùn để tạo ra dạng viên nhỏ và đưa đi sấy bằng không khí nóng. Ở quy mô lớn người ta sấy tầng sôi. Sản phẩm thu được có độ ẩm 10% được mang đi nghiền và sàng với kích thước 60 mesh (250 micron).

Quy trình acid alginic

Trong quy trình này, các bước từ 1-5 giống quy trình trên. Sau khi thu được dịch chiết người ta tiến hành các bước sau đây.

Công đoạn 6: Tẩy trắng

Trong công đoạn này, dịch chiết được tẩy trắng bằng cách thêm dung dịch nước javel 12% vào nhưng do thể tích lớn, việc tiêu tốn javel làm cho một số nhà sản xuất chuyển công đoạn này ra phần cuối của quy trình.

Công đoạn 7: Kết tủa acid alginic

Trong công đoạn này, người ta dùng acid sulfuric hoặc HCl để kết tủa. Acid alginic sẽ có dạng gel mềm, nhầy nhớt và rất khó lọc. Do đó người ta tiến hành công đoạn này bằng cách cho hơi dư một ít soda, khí CO_2 tạo thành khi phản ứng tạo acid alginic sẽ bám vào khối gel acid và làm các màng gel này nổi lên bề mặt. Cần có thời gian để phản ứng xảy ra đầy đủ và thu được các màng gel có độ chắc tốt. Khi thao tác cần nhẹ nhàng tránh làm vỡ các màng gel.

Phản ứng được tiến hành bằng cách dùng acid sulfuric 5% và pH khống chế khoảng 1.5-2. Hỗn hợp để yên trong một giờ để phản ứng xảy ra hoàn toàn. Cuối cùng thu hồi lớp gel nổi lên bề mặt và bỏ lớp nước phía dưới.

Công đoạn 8: tách nước khỏi acid alginic

Đây là công đoạn khó khăn nhất của quy trình này vì gel của acid alginic rất mềm, khi ép dễ vỡ và làm tắc vải bọc. Nếu ép bằng máy sẽ dễ chui qua mắt lưới. Nước được tách bằng hai cách: a/ ép hoặc li tâm, b/ dùng ethanol để kết tủa.

Khi dùng phương pháp ép, acid alginic được cho vào các túi vải và đưa vào máy ép thuỷ lực với tốc độ chậm để nước thoát ra cho đến khi đạt độ khô 20%. Người ta cũng có thể dùng máy ép đai. Khi li tâm người ta cũng cho vào túi vải và li tâm đến độ khô 7-8%. Sau đó dùng máy ép vít sẽ thuận lợi hơn.

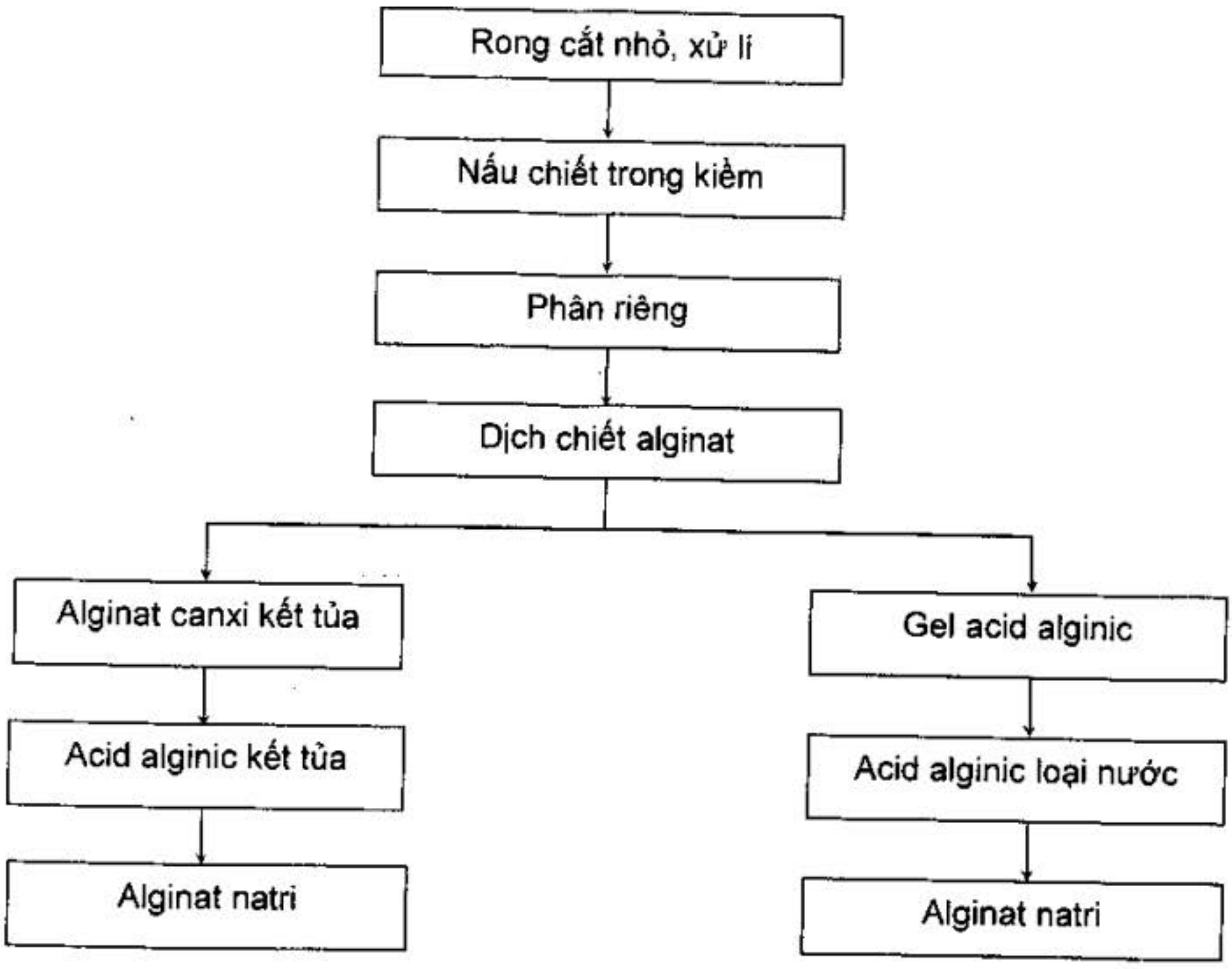
Phương pháp dùng ethanol chỉ phù hợp trong phòng thí nghiệm vì đắt tiền và cần có thiết bị thu hồi.

Công đoạn 10: Chuyển acid alginic sang dạng alginat natri

Sau khi ép tách nước, ta thu được acid alginic có độ khô 25% và được cho vào dung môi là ethanol. Sau đó dung dịch NaOH đậm đặc 40% được cho vào để trung hoà. Phản ứng này xảy ra chậm chạp và phụ thuộc vào sự thẩm

thấu của kiềm vào trong khối gel acid alginic. Rất khó để đạt được sản phẩm đồng thể. Phản ứng được theo dõi bằng cách lấy mẫu và đo pH trong dung dịch nước vì độ pH trong ethanol không cho biết mức độ của phản ứng. Khi pH của mẫu thu được là 6 thì dừng phản ứng. Đem huyền phù đi lọc và li tâm.

Một cách khác là cho acid alginic có độ khô lớn, khoảng 20% trở lên vào máy trộn paste và cho dung dịch NaOH vào cùng với ethanol để tạo các sợi kết tủa của alginat natri. Sau đó đem các sợi đó đi ép tách lỏng và sấy. Ethanol được sử dụng cần được thu hồi.



Hình 5.10 Sơ đồ quy trình công nghệ tách chiết alginat natri

Cần chú ý rằng các thông số tách chiết alginat và các polymer sinh học nói chung phụ thuộc rất lớn vào nguồn rong. Ngay trong cùng một nhà máy, khi đổi từ loài rong này sang loài rong khác, cần có các thử nghiệm ở quy mô pilot để tìm các thông số tách chiết thích hợp. Nếu bỏ qua bước thử nghiệm, việc tách chiết sẽ cho alginat có chất lượng kém.

Hiện nay, công nghệ tách chiết alginat liên tục đang được phát triển. Theo công nghệ tách chiết loại ép đùn (extrusion), alginat được tách chiết trong một máy ép vít dài, do đó quá trình khuấy đảo và làm đồng đều dung dịch tốt hơn. Năng lượng tiêu tốn cũng giảm đi. Sản phẩm thu được có hiệu suất và độ nhớt cao.

5. Ứng dụng

a) Công nghiệp in vải

Đây là một trong những ứng dụng mạnh nhất của alginat. Alginat dùng làm chất tạo độ quánh cho dạng paste của mực in. Mực in này sẽ thấm qua lưới hay thiết bị in con lăn để đi đến vải. Nó giúp cho mực in liên kết hoá học sợi cellulose qua các nhóm hydroxyl. Rất nhiều chất tạo độ quánh khác cho mực in như tinh bột thường phản ứng với màu và làm cho hiệu suất in kém đi. Alginat phản ứng ít nhất với mực in và dễ rửa sạch, do đó nó là chất tạo độ quánh tốt nhất để in vải.

b) Thực phẩm

Alginat được dùng trong thực phẩm để tạo độ nhớt, tạo gel và các tính chất chung của keo. Đối với ứng dụng tạo độ nhớt, alginat được dùng trong nước xốt, si-rô, kem, nhân bánh. Ứng dụng tạo gel trong các loại thực phẩm như jelly, kem, thức ăn gia súc và trái cây mô phỏng (reformed fruit). Các tính chất chung của keo được ứng dụng là kem để tạo độ mịn do làm giảm kích thước tinh thể nước đá. Propylen glycol alginat dùng làm chất ổn định bọt trong bia hay dùng để ổn định các hạt rắn trong nước uống (thể huyền phù).

Một trong những ứng dụng quan trọng của alginat trong thực phẩm là tạo thịt tái cấu trúc (restructure meat products). Alginat cùng với các chất canxi carbonate, acid lactic và canxi lactate được dùng để thay các chất kết dính là NaCl và các muối phosphate do đó làm giảm lượng muối Na trong khẩu phần ăn.

Alginat được dùng trong các sản phẩm tương tự như thịt tôm, cua bằng protein đậu nành cô đặc hay caseinate natri. Nó cũng được dùng tạo sản phẩm trái cây tương tự.

Alginat còn được phối trộn với pectin trong mứt trái cây hay xốt mayonnaise. Có rất nhiều ứng dụng cụ thể của alginat trong thực phẩm mà khó có thể liệt kê đầy đủ.

c) Chất xúc tác sinh học cố định

Tính chất tạo gel của alginat là nền tảng của một ứng dụng vô cùng quan trọng của alginat. Đó là cố định các chất xúc tác sinh học bao gồm các enzyme và các tế bào.

Theo phương pháp thông thường, khi muốn sản xuất một chế phẩm sinh học với chất xúc tác là enzyme hay tế bào, người ta cho enzyme và tế bào tự do vào dung dịch phản ứng. Khi phản ứng kết thúc, người ta thu được sản phẩm lẫn với tế bào và enzyme. Sau đó phải lọc ra và tinh chế. Tế bào và enzyme đó bị loại bỏ. Như vậy sẽ lãng phí đặc biệt trong trường hợp enzyme hay tế bào đó khó thu nhận được. Mặt khác phản ứng khó điều khiển và kết thúc. Sản phẩm cuối phải tốn công đoạn tinh chế tách tế bào và enzyme.

Theo phương pháp cố định, tế bào hoặc enzyme được giữ cố định trên một giá thể có thể bằng vật liệu khác nhau. Các giá thể đó có thể tương tác tốt hay xấu với enzyme hoặc tế bào. Trong số các giá thể đó, alginat tỏ ra có tính tương thích sinh học cao, tốt cho hoạt động của các enzyme và các tế bào sống. Mạng lưới gel alginat canxi trong nhiều công trình đã chứng tỏ phù hợp cho các loại enzyme và tế bào sống khác nhau. Các tế bào hay enzyme được cố định, hay như thuật ngữ ở đây là bẫy (entrapment) trên mạng lưới gel ba chiều. Lỗ xốp tạo nên giữa các lưới gel đủ lớn để cho các phân tử cơ chất đi vào tiếp xúc với enzyme hay tế bào và để cho các chất tạo thành sau phản ứng đi ra khỏi lưới gel nhưng vẫn đủ nhỏ để nhốt các phân tử enzyme hay tế bào sống.

Các phản ứng dùng chất xúc tác cố định có các ưu điểm là có thể sản xuất liên tục, kiểm soát được phản ứng, chất tạo thành sạch không bị nhiễm bẩn bởi tế bào, tiết kiệm được enzyme và tế bào vì không phải nuôi cấy lại cho mỗi mẻ phản ứng, hoạt tính tế bào duy trì được trong thời gian rất lâu so với tế bào tự do. Tuy vậy, các mạng lưới gel vẫn bị suy giảm theo thời gian do va chạm cơ học trong dòng cơ chất đối lưu, do suy thoái vì thất thoát ion tạo gel (như canxi) do trao đổi ion với dung dịch, làm thất thoát enzyme hay tế bào, hoạt tính tế bào suy giảm theo thời gian do dòng cơ chất chỉ định hướng cho một số ít cơ chất và tránh làm nhiễm bẩn sản phẩm tạo thành. Do đó sau một thời gian hoạt động, người ta phải bổ sung ion và các thành phần dinh dưỡng để sửa chữa mạng lưới gel cũng như hoạt hoá lại tế bào. Phản ứng cũng bị giới hạn cho các cơ chất có phân tử nhỏ để có thể đi qua mạng lưới gel dễ dàng.

Thao tác tiến hành cố định tế bào khá đơn giản. Trộn đều dịch tế bào với dung dịch alginat có nồng độ từ 2-4%. Sau đó nhỏ giọt vào dung dịch $CaCl_2$ có nồng độ 0,05-0,1M và để yên trong 30 phút đến vài giờ. Các phân tử alginat trong hạt gel sẽ di chuyển ra lớp bề mặt giọt alginat để tạo gel. Trong quá trình đó nó kéo theo các tế bào. Khi cắt ngang các hạt gel, ta quan sát thấy mật độ tế bào dày đặc ở gần bề mặt so với mật độ thưa hơn ở phía trong. Giữa hạt gel là lỗ trống. Điều này cũng có thuận lợi là các phân tử cơ chất dễ tiếp xúc với các tế bào hơn và sản phẩm tạo thành dễ đi ra khỏi hạt gel hơn. Các hạt gel thường có đường kính 3-5mm khi dùng các pipet để tạo giọt. Hiện nay người ta dùng nhiều phương pháp khác nhau như vòi phun,

tĩnh điện để tạo các vi hạt có đường kính vài chục micron đến vài trăm micron.

Alginat dùng trong lĩnh vực này thường chọn loại có hàm lượng guluronic cao như alginat từ Laminaria hyperborea của Na Uy hay các loài rong thuộc giống Sargassum, Turbinaria ở Việt Nam, Ấn Độ và Philippines. Nhóm nghiên cứu NOBIPOL thuộc trường đại học Trondheim, Na Uy, do giáo sư Smisrod dẫn đầu đã thành công trong việc tách được enzyme epimerase từ vi sinh vật để chuyển các gốc mannuronic thành guluronic. Do đó khi ứng dụng thành công vào công nghiệp, phương pháp này có thể cho ra đời các sản phẩm alginat có hàm lượng guluronic rất cao không phụ thuộc vào loài rong cung cấp.

Khi cần thu nhận lại tế bào, người ta có thể làm tan gel bằng các tác nhân càng cua như polyphosphat hay EDTA. Khi các ion canxi bị lấy đi, mạng lưới gel sẽ tan chảy và giải phóng các tế bào.

Trong vài thập niên, kĩ thuật này đã đạt được nhiều thành công và ứng dụng ở quy mô công nghiệp. Đó là sản xuất ethanol từ tinh bột, sản xuất bia, sản xuất acid citric, sản xuất yaourt liên tục, lên men butanol và isopropanol, sản xuất prednisolone từ hydrocortisone, sản xuất glycerol từ rong biển, cố định các tế bào để sản xuất kháng thể đơn dòng, sản xuất insuline...

d) Y dược

Acid alginic không tan trong nước nhưng có tính hút nước và trương nở. Do đó nó được dùng làm tá dược thay cho tinh bột. Nó có ưu điểm là giải phóng thuốc tốt, có thể thêm vào trong quá trình tạo viên, làm cho viên thuốc bền cơ học hơn so với tinh bột.

Alginat được dùng làm chất nhả chậm thuốc là một trong các xu hướng nghiên cứu mạnh hiện nay trong ngành dược vì nó duy trì nồng độ thuốc lâu dài, tránh tăng nhanh và thải hồi sớm như các loại thuốc truyền thống, do đó hiệu quả điều trị tốt hơn.

Alginat natri có thể dùng làm thuốc giảm đau bao tử kết hợp với canxi carbonat. Khi uống vào, dịch acid trong bao tử tạo thành acid alginic và CO_2. Acid alginic nổi lên phía trên của bao tử và tạo thành một lớp bảo vệ vùng thượng vị.

Do tính chất hấp thu một số ion rất mạnh, alginat được dùng làm thuốc để hấp thu các nguyên tố phóng xạ, như nguyên tố Sr 90, Iod 131, cho các bệnh nhân nhiễm xạ hay dân cư vùng bị nhiễm xạ.

Alginat còn có tính dính sinh học (bio-adhesion) do đó người ta tạo ra các vi hạt chứa thuốc để bơm vào nơi có các khối u hay mô bị tổn thương. Các vi hạt đó tạo thành từ alginat canxi dính vào các mô bị bệnh. Dịch cơ thể có hàm lượng Na^+ sẽ trao đổi ion với Ca^{2+} làm tan dần các vi hạt chứa thuốc.

Bằng cách này, thuốc được đưa trực tiếp đến các mô bị tổn thương mà không làm tăng nồng độ thuốc toàn thân.

Cũng dựa trên tính chất trao đổi ion giữa alginat canxi và ion Na^+ trong cơ thể, người ta làm gạc chống dính từ alginat canxi. Gạc được chế tạo từ các sợi gel alginat canxi. Khi dùng băng vết thương, sợi alginat canxi chuyển sang alginat natri do trao đổi ion Na^+ từ dịch cơ thể và làm cho gạc bị hoà tan ở nơi tiếp xúc với vết thương.

Trong những năm gần đây, các ứng dụng của polymer sinh học trong nghiên cứu y sinh học phát triển mạnh mẽ. Để hiểu rõ các ứng dụng đó, sau đây sẽ trình bày các tính chất sinh học của alginat.

Tính sinh miễn dịch (immunogenicity)

Alginat bán trên thị trường có các loại (grade) siêu tinh khiết (ultra pure), thực phẩm hay nghiên cứu. Khi nghiên cứu độc tính của alginat và khả năng hoạt hoá các tế bào lymphocyte, người ta thấy rằng các tạp chất trong rong gây phân bào (mitogenic impurities) trong alginat thương mại là nguyên nhân gây ra các tác dụng phụ. Các tác dụng phụ là giải phóng cytokine và gây viêm. Alginat có hàm lượng mannuronic cao hoạt hoá việc sản sinh cytokine chiều hơn alginat có hàm lượng guluronic cao. Do đó alginat siêu tinh khiết giàu guluronic được dùng trong nghiên cứu *in vivo*. Khi cấy dưới da, alginat nói trên gây đáp ứng miễn dịch nhỏ hơn polyvinyl acohol và agarose.

Tính dính sinh học

Tính dính sinh học được định nghĩa khi hai bề mặt tiếp xúc hay dính vào nhau trong đó có một bề mặt là nền sinh học. Nếu một bề mặt có tính nhầy (mucosal), ta gọi là dính nhầy (mucoadhesion). Các polymer loại polyanion có tính dính sinh học lớn hơn các polymer polycation hoặc trung tính. Do đó alginat là một polymer anion có tính dính sinh học. Nghiên cứu làm dính alginat trên ruột chay (jejunum) tốt hơn các polymer khác như polystyren, chitosan, carboxymethylcellulose và poly(lactic acid). Hệ thống nhả chậm thuốc có tính dính sinh học làm tăng thời gian lưu giữ thuốc tại vùng hoạt tính hay tái hấp thụ. Tính dính sinh học của alginat tạo khả năng dùng nó làm chất mang thuốc đến nhưng mô nhầy như nasopharynx (vùng vòm họng).

Bọc protein (protein encapsulation)

Đã có rất nhiều công trình nghiên cứu dùng alginat để bọc các loại protein. Khi uống các loại thuốc có khả năng cản trở sự phân bào, thường gây tác dụng phụ là làm tăng nhanh lớp biểu mô ở niêm mạc ruột. TGF-β_1 được biết như là chất gây ức chế sự phát triển của nhiều tế bào ở vùng biểu mô được kết hợp với alginat để thử nhiệm trên chuột. Kết quả cho thấy alginat không bị ảnh hưởng bởi pH thấp của dạ dày và khi đi vào ruột, nó nhả chậm thuốc

và như thế bảo vệ thuốc khỏi bị phá huỷ bởi pH thấp ở dạ dày (Mumper, 1994).

Trong nghiên cứu vaccine, đối với các bệnh lây qua đường không khí và hô hấp có liên quan đến mạng nhầy là rất khó sử dụng vaccine. Các nhà miễn dịch học nhận thấy rằng việc gây miễn dịch tại bề mặt màng nhầy, nơi sinh ra kháng nguyên bảo vệ immunoglobulin A (IgA) là rất có ý nghĩa. Do đó người ta đã phát triển thành công một hệ thống nhả thuốc trên bề mặt màng nhầy. Thí nghiệm cho thấy khi dùng các vi hạt chứa vaccine làm từ alginat bọc poly-L-lysine đưa vào trong mũi của chuột, đáp ứng miễn dịch xảy ra mạnh hơn qua hàm lượng IgA cao được phát hiện trong dịch rửa túi phổi. Trong khi đó kháng nguyên không có alginat không gây được đáp ứng miễn dịch. Thí nghiệm chứng tỏ alginat có thể dùng làm chất mang trong việc giải phóng vaccin hay thuốc ở vùng hô hấp trên (Wayne, 1998).

Trong việc nhả chậm thuốc, alginat được áp dụng đối với bFGF (basic fibroblast growth factor) là chất có nhiều chức năng trong kích thích sự phát triển của tế bào và sửa chữa mô. Loại thuốc này có thời gian bán rã ngắn khi đưa vào con đường bên ngoài ruột (parenteral route) và không ổn định trong dung dịch. Khi bọc bằng các vi hạt alginat, hiệu quả của thuốc lên đến 77%, thuốc được nhả chậm trong 14 ngày (Edelman, 1991).

Việc áp dụng thành công cố định tế bào hybridoma trên gel alginat bọc poly-L-lysine để sản xuất kháng thể đơn dòng (mAbs) ở quy mô công nghiệp được công bố lần đầu tiên năm 1985 (Rupp). Đây là một thành công có ý nghĩa lớn của việc ứng dụng alginat. Kết quả cho thấy có thể thu được mAbs với độ tinh khiết cao trên 98% và giá thành hạ.

Alginat và các hoạt tính liên quan đến chất xơ

Trước đây, alginat chỉ được coi là phụ gia thực phẩm để tạo độ quánh, tạo gel và làm chất ổn định. Tuy vậy, gần dây, alginat được xem như nguồn cung cấp chất xơ cho cơ thể với các tính năng mới như giảm hàm lượng glucose/cholesterol trong máu và do đó giảm nguy cơ mắc các bệnh như tiểu đường type II, béo phì và tim mạch. Khi alginat vào dạ dày, độ acid cao tại đó sẽ chuyển alginat sang dạng gel của acid alginic và làm giảm sự hấp thu trong hệ tiêu hoá. Alginat cũng ảnh hưởng tốt đến hệ vi sinh vật ở trực tràng qua việc ức chế các vi sinh vật bất lợi gây thối rữa trong trực tràng. Một số nghiên cứu cho thấy alginat còn làm tăng màng nhầy ở ruột, làm lành vết thương trong hệ dạ dày đường ruột, kích thích hệ miễn dịch đường ruột.

Tuy vậy việc dùng alginat liều cao có thể gây bất lợi cho cơ thể do hạn chế sự hấp thu các chất dinh dưỡng như β-caroten, các chất khoáng như canxi, sắt, chrom và cobalt.

CHƯƠNG 6

CARRAGEENAN

1. Sơ lược lịch sử, thuật ngữ

Carrageenan là tên thương mại của một loại keo ưa nước tách chiết từ một số loài rong đỏ (Rhodophyta), chúng đóng vai trò như cellulose trong thực vật trên cạn. Về mặt hoá học, loại keo này là các galactan có độ sulfate hoá cao. Do mức độ sulfate hoá cao, carrageenan là một polymer mang điện tích âm mạnh. Agar do mức độ sulfate hoá ít, được xem như là trung hoà điện trong nhiều ứng dụng (nonionic). Alginat có độ âm điện do các nhóm carboxyl nên yếu hơn các nhóm sulfate trong carrageenan.

Carrageenenan được tách chiết đầu tiên từ rong *Chondrus crispus* và *Gigartina stellata* ở châu Âu trong nhiều thế kỉ để làm jelly và bánh pudding sữa. Năm 1862, Standford đặt tên carrageenin cho keo rong chiết từ rong *Chondrus crispus*. Thuật ngữ carrageenan có nguồn gốc từ chữ carraigeen, nghĩa là rêu đá.

Hiện nay carrageenan được tách chiết từ các loài rong *Kappaphycus alvarezii, Eucheuma denticulatum, Betaphycus gelatinum, Chondrus crispus, Gigartina skottsbergii, Sarcothalia crispata, Mazzaella laminaroides, Gigartina canaliculata.*

Kappaphycus alvarezii, Eucheuma denticulatum được thu hoạch từ tự nhiên ở Indonesia và Philippines. Từ thập niên 1970, hai nước này trồng các loài trên và hiện nay thu hoạch chính là từ rong trồng trọt. Việt Nam những năm gần đây cũng đã trồng thành công rong *Kappaphycus alvarezii.*

Rong *Betaphycus gelatinum* mọc hoang dại được thu hoạch ở đảo Hải Nam, Trung Quốc, Đài Loan và Philippines và nó cũng được trồng ở đảo Hải Nam.

Chondrus crispus được thu hoạch ở Canada, Mĩ và Pháp.

Gigartina skottsbergii, Sarcothalia crispata và *Mazzaella laminaroides* được thu hoạch từ tự nhiên.

Gigartina skottsbergii được thu hoạch ở Argentina.

Gigartina canaliculata thu hoạch ở Mexico (Baja California)

Hypnea musciformis mọc ở bờ biển Brazil.

Chondrus crispus

Kappaphycus alvarezii

Hình 6.1 Một số loài rong dùng tách chiết carrageenan

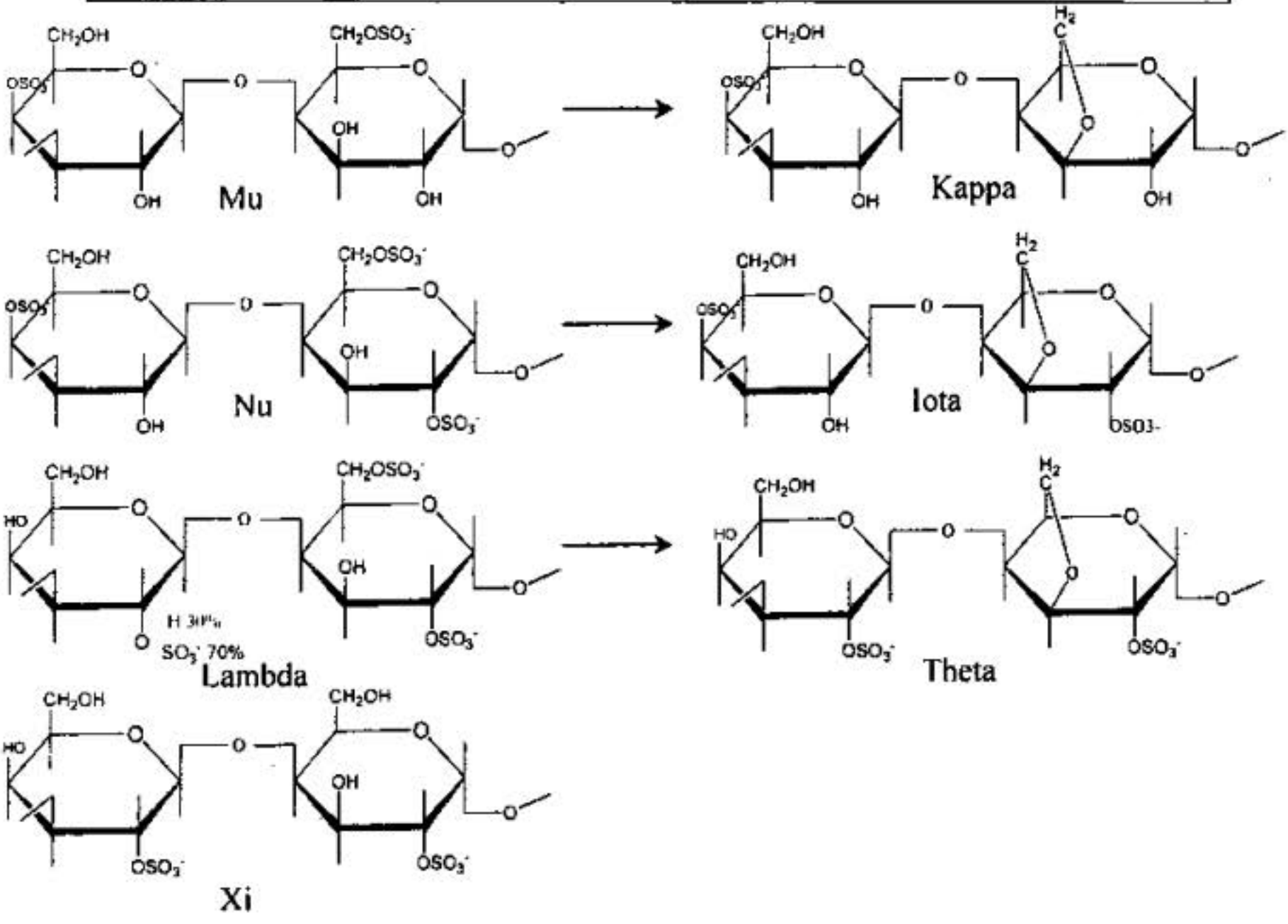
2. Cấu trúc hoá học

Carrageenan là tên gọi chung của các polysaccharide có cấu trúc luân phiên giữa β-D-galactopyranosyl và α-D-galactopyranosyl qua các liên kết 1-3 và 1-4. Các gốc sulfate nằm ở các vị trí C2 và C4. Gốc liên kết ở vị trí C4 có dạng 2-sulfate, 2,6-disulfate, 3,6-anhydrid, 3,6-anhydrid 2-sulfate. Không bao giờ có nhóm sulfate ở vị trí C3.

Người ta phân ra các loại carrageenan dựa trên cấu trúc hoá học của chúng. Carrageenan có cấu trúc mạch thẳng luân phiên của hai gốc, kí hiệu trong hình 6.2 là A và B, tuỳ theo cấu trúc của hai gốc A và B, ta có các loại carrageenan theo các tên lambda, kappa, iota, xi, theta, nu, mu.

——B—— A——B——A——

Gốc A	Có trong loại carrageenan
D-galactose 2-sulfat	Xi
D-galactose 6-sulfat	Mu
D-galactose 2,6-disulfat	Lamda, Nu
3,6-anhydro-D-galactose	Kappa
3,6-anhydro-D-galactose 2-sulfat	Iota, Theta
Gốc B	
D-galactose	Lamda, Theta
D-galactose 2-sulfat	Lamda, Xi, Theta
D-galactose 4-sulfat	Nu, Mu, Kappa, Iota

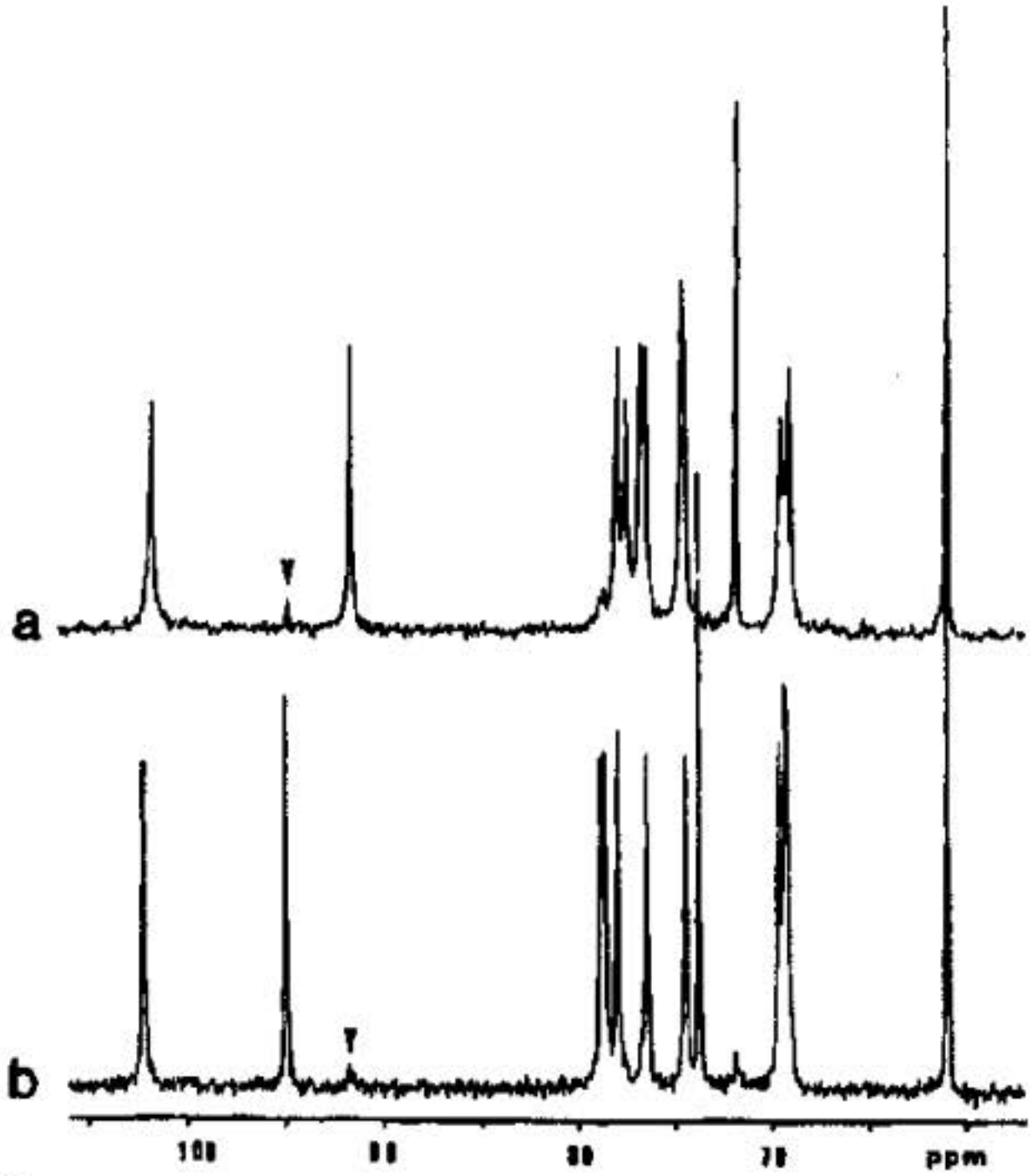


Hình 6.2 Cấu trúc hoá học của các loại carrageenan khác nhau (R.L. Davidson. New York, McGraw-Hill, 1980)

Bảng 6.1 Thành phần carrageenan trong một số loài rong đỏ

Loài rong	Thành phần carrageenan
Chondrus crispus	Hỗn hợp kappa and lambda
Kappaphycus alvarezii	Chủ yếu là kappa
Eucheuma denticulatum	Chủ yếu là iota
Gigartina skottsbergii	Chủ yếu là kappa, có ít lambda
Sarcothalia crispata	Hỗn hợp của kappa và lambda

Bằng phương pháp cộng hưởng từ có thể xác định được các loại carrageenan khác nhau như hình dưới đây.



Hình 6.3 Phổ ^{13}C NMR của carageenan tách chiết từ rong Euchema spinosum chứa chủ yếu là iota-carrageenan (a)và Euchema cottonii (Kappaphycus alvarezii) chứa chủ yếu là kappa carrageenan (b) (Rochas, 1989)

3. Tính chất

Hiện nay người ta ghi nhận được khoảng 15 cấu trúc carrageenan khác nhau (Lahaye 2001). Tuy vậy carrageenan thương mại bao gồm ba loại chính là iota, kappa và lambda. Các tính chất của chúng như bảng dưới đây.

Bảng 6.2 Tính chất của các loại carrageenan thông dụng

Iota	Gel đàn hồi với muối canxi. Gel trong suốt và không bị rỉ nước, ổn định khi làm đông và tan giá nhiều lần.
Kappa	Tạo gel chắc, răn với muối kali. Tạo gel dòn với muối canxi. Gel hơi mờ đục, khi thêm đường sẽ trong hơn. Gel bị rỉ nước một ít.
Lambda	Không tạo gel mà cho dung dịch có độ nhớt cao.

Hoạt tính của carrageenan là do các gốc sulfat bán ester là các ion âm mạnh. Dạng acid tự do không bền nên carrageenan thương mại thường ở dạng muối natri, kali, canxi hoặc hỗn hợp của cả ba loại muối đó. Các ion dương liên kết với các gốc đường trong mạch polymer xác định tính chất vật lí của carrageenan. Kappa và iota carrageenan tạo gel với ion kali và canxi trong khi lambda không tạo gel.

Hoạt tính với protein thể hiện ở cả hai loại carrageenan tạo gel và không tạo gel. Phản ứng phụ thuộc vào tỉ số điện tích giữa protein và carrageenan và phụ thuộc vào điểm đẳng điện của của protein, pH của hệ thống, tỉ số khối lượng của carrageenan và protein. Khi pH nhỏ hơn điểm đẳng điện, protein mang điện dương và do đó tương tác tĩnh điện trực tiếp với carrageenan mang điện tích âm. Phản ứng quan trọng có ý nghĩa thương mại giữa carrageenan và kappa casein trong sữa là đặc trưng cho loại protein này và là phản ứng duy nhất xảy ra ở trên mức pH đẳng điện của casein. Nó xảy ra do vùng mang các acid amin tích điện dương của phân tử kappa-casein tương tác tĩnh điện với các gốc sulfate của carrageenan mặc dù điện tích tổng cộng của casein là âm.

Tính chất chức năng của carrageenan phụ thuộc vào tính chất lưu biến của nó. Carrageenan là một polymer mạch thẳng, tan trong nước, tạo dung dịch có độ nhớt cao. Đó là do cấu hình và tính đa điện li của nó. Lực đẩy tương hỗ giữa các nhóm sulfate bán ester dọc theo mạch làm cho phân tử carrageenan duỗi ra nhiều nhất. Trong khi đó, tính ưa nước làm cho nó được bao bọc bởi các phân tử nước cố định. Cả hai nhân tố đó làm tăng lực cản khi dòng chuyển động.

Độ nhớt của dung dịch carrageenan phụ thuộc vào loại carrageenan, khối lượng phân tử, nồng độ, nhiệt độ dung dịch và sự có mặt của các chất tan khác. Độ nhớt của dung dịch tăng theo hàm mũ với nồng độ. Dạng biến đổi này là điển hình đối với polymer mạch thẳng mang điện tích và khi tăng nồng độ sẽ tăng tương tác giữa các chuỗi phân tử. Các loại muối làm giảm độ nhớt do làm giảm lực đẩy tĩnh điện của các nhóm sulfate. Ở nhiệt độ thấp và nồng độ muối cao, carrageenan có thể tạo gel, làm tăng độ nhớt biểu kiến của dung dịch. Điều này thấy rõ đối với ion kali và canxi, là hai ion tạo gel mạnh. Nhưng khi nhiệt độ cao, ion canxi lại làm giảm độ nhớt nhiều hơn là ion natri và kali.

Độ nhớt của dung dịch carrageenan giảm theo hàm mũ khi nhiệt độ tăng. Biến đổi này có tính thuận nghịch ở pH gần 9 và không kéo dài sự nung nóng đủ để sự phân cắt mạch xảy ra. Các loại carrageenan tạo gel và không tạo gel đều biến đổi cùng chiều trên điểm tạo gel. Khi làm lạnh, sự tạo gel sẽ làm tăng độ nhớt biểu kiến đột ngột khi đạt đến điểm tạo gel khi có mặt của các ion K^+ và Ca^{++}.

Khi đo độ nhớt nội ở khoảng nồng độ 0,03-0,15 g/dL và nhiệt độ 25^0C, Nickersona nhận thấy độ nhớt nội không bị ảnh hưởng bởi lực ion của K^+ và Ca^{++}. Giá trị trung bình của độ nhớt nội khoảng 41,5 dl/g (Nickersona và cộng sự, 2004).

Độ nhớt động học của carrageenan nằm trong khoảng 5-800 mPa.s ở nồng độ 1,5% và nhiệt độ 75^0C. Dung dịch carrageenan có độ nhớt nhỏ hơn 100 mPa.s có tính chất chảy giống dung dịch Newton. Ở độ nhớt cao hơn, dung dịch thể hiện động thái chảy theo quy luật pseudoplastic (hay shear-thinning), có nghĩa là tốc độ trượt càng lớn thì độ nhớt càng giảm. Do đó khi xác định độ nhớt, cần nêu rõ tốc độ trượt.

Carrageenan khi dùng tạo độ nhớt cho dung dịch nước thường là loại lambda hay muối natri của lambda và kappa. Chúng có thể hoà tan trong nước lạnh hoặc nước nóng. Độ nhớt cao là do khối lượng phân tử và tính ưa nước của lambda carrageenan tạo thành. Đối với các ứng dụng tạo gel, thường dùng dung dịch có độ nhớt thấp trong nước nóng để dễ thao tác. Các muối canxi và kali của kappa và iota có độ bền gel cao do ít ưa nước và do ảnh hưởng của ion canxi.

Kappa và iota carrageenan tạo gel khi làm lạnh dung dịch nóng của chúng với sự có mặt của các ion như K^+ và Ca^{++}. Ở nhiệt độ cao, các chuỗi phân tử phân bố ngẫu nhiên trong dung dịch. Khi nhiệt độ thấp các chuỗi liên kết với nhau để tạo thành các chuỗi xoắn kép và tạo thành các vùng (domain). Điều này xảy ra bất kể sự có mặt của các ion trái dấu hay không và không trực tiếp dẫn đến sự tạo gel. Chỉ khi có mặt các ion nói trên, các vùng mới

kết hợp với nhau tạo thành các mạng lưới không gian 3 chiều và tạo gel. Gel thể hiện tính chất viscoelastic. Nickerson (2004) đã chứng tỏ ở nhiệt độ 60^0C, lúc đó kappa-carrageenan ở cấu hình cuộn (coil), khi thêm ion K^+ hoặc Ca^{2+} sẽ làm giảm bán kính hồi chuyển R_g của phân tử. Ion Ca^{2+} làm giảm bán kính hồi chuyển mạnh hơn K^+ nhưng hạ nhiệt độ đến 25^0C, sự khác nhau của bán kính hồi chuyển giữa việc cho thêm ion Ca^{2+} hay K^+ không lớn. Khi hạ nhiệt độ từ 60^0C đến 25^0C, bán kính hồi chuyển của kaapa-carrageenan khi không có ion giảm 18%, có ion K^+ giảm 17,6% và đối với ion Ca^{2+} giảm 2,7% và cả ba giá trị cuối gần nhau hơn khi nhiệt độ cao. Như vậy ở nhiệt độ thấp, cường độ chuyển động nhiệt giảm làm cho các phân tử dễ cuộn lại và kết hợp với nhau, xúc tiến các cấu hình trật tự hơn. Cũng trong công trình này, với nồng độ carrageenan nhỏ hơn nồng độ c^* (critical overlap concentration), không có sự khác biệt đáng kể của cường độ ion đến độ nhớt nội.

Người ta nhận thấy các gốc 6-sulfate trong mạch polymer của kappa và iota-carrageenan làm giảm độ bền gel. Điều này được cho là các gốc này tạo nên các nút ngăn cản sự tạo thành các vòng xoắn kép. Xử lí kiềm khi tách chiết sẽ chuyển các gốc 6-sulfate thành các gốc 3,6 anhydride, làm tăng tính kị nước và do đó tăng khả năng tạo gel.

Gel của kappa carrageenan tương đối rắn và bị rỉ nước. Khi thêm locus bean galactomanan có thể giảm hiện tượng này. Gel của iota ít rỉ nước hơn. Đó là do các gốc 2-sulfate trên các gốc 3,6 anhydride ngăn cản sự kết hợp quá chặt tạo nên độ cứng của gel kappa. Kali hiệu quả hơn canxi khi tạo gel của kappa nhưng đối với iota thì ngược lại.

Tất cả các loại carrageenan đều tạo gel khi làm lạnh dung dịch carragéenan trong sữa nóng. Ngay cả lambda là loại không tạo gel bất kể ion có tồn tại hay không cũng tạo gel ở mức 0,2% hay hơn tuỳ theo khối lượng sữa. Đó là do sự tạo thành liên kết carrageenan-casein đã mô tả ở trên.

Carrrageenan bị thuỷ phân trong môi trường acid. Ở nhiệt độ cao và pH thấp, các tính chất chức năng bị mất nhanh chóng. Có thể dùng carrageenan trong môi trường acid nhưng không được nung nóng lâu. Tốc độ thuỷ phân ở cùng pH và nhiệt độ đã cho xảy ra ở thể gel chậm hơn ở thể sol.

Carrageenan được FDA xếp vào nhóm các thực phẩm an toàn (GRAS). Nó đã được thử nghiệm và chứng tỏ không gây quái thai và không phải là tác nhân ung thư.

4. Tách chiết

Có hai phương pháp tách chiết carrageenan. Một phương pháp truyền thống tách carrageenan ra khỏi rong, sau đó lọc và tách nó ra khỏi dung dịch. Phương pháp này đắt tiền và đòi hỏi nhiều thiết bị. Cách thứ hai người ta xử

lí cây rong để loại bớt tạp chất nhưng vẫn để yên carrageenan trong cây rong cùng với cellulose. Phương pháp này không cho carrageenan tinh khiết nhưng vẫn dùng được cho một số ứng dụng về thực phẩm.

Phương pháp tinh chế carrageenan lần đầu tiên áp dụng cho rong *Chondrus crispus* và được áp dụng cho đến thập niên 1980. Rong biển được rửa sạch tạp chất, cát và muối. Sau đó được nấu trong dung dịch kiềm NaOH trong vài giờ. Nồng độ, nhiệt độ và thời gian được thử nghiệm ở quy mô pilot trước khi áp dụng vào sản xuất. Kiềm giúp loại bỏ nhóm sulfate, làm tăng các gốc 3,6 anhydride galactose do đó làm tăng độ bền gel. Bã rong được loại bỏ bằng li tâm hoặc lọc. Dịch chiết thường chứa 1-2% carrageenan và được cô đến nồng độ 2-3% bằng phương pháp cô chân không hoặc siêu lọc.

Dịch lọc trong được tách carrageenan bằng hai cách. Phương pháp kết tủa bằng alcohol dùng cho tất cả loại carrageenan. Phương pháp tạo gel chỉ dùng cho kappa-carrageenan. Gel sau đó được ép tách nước hoặc làm đông tan giá để tách nước.

Theo phương pháp kết tủa, isopropanol được thêm vào dung dịch chiết để kết tủa dạng sợi, sau đó chúng được tách ra bằng máy li tâm hoặc lưới lọc. Sau đó các sợi đông kết được ép để tách dung môi và được rửa lại bằng alcohol để loại nước sâu xa hơn. Chúng được sấy khô, nghiền đến kích thước 80 mesh hay mịn hơn. Alcohol được thu hồi ở dạng lỏng hoặc hơi và cho tuần hoàn lại.

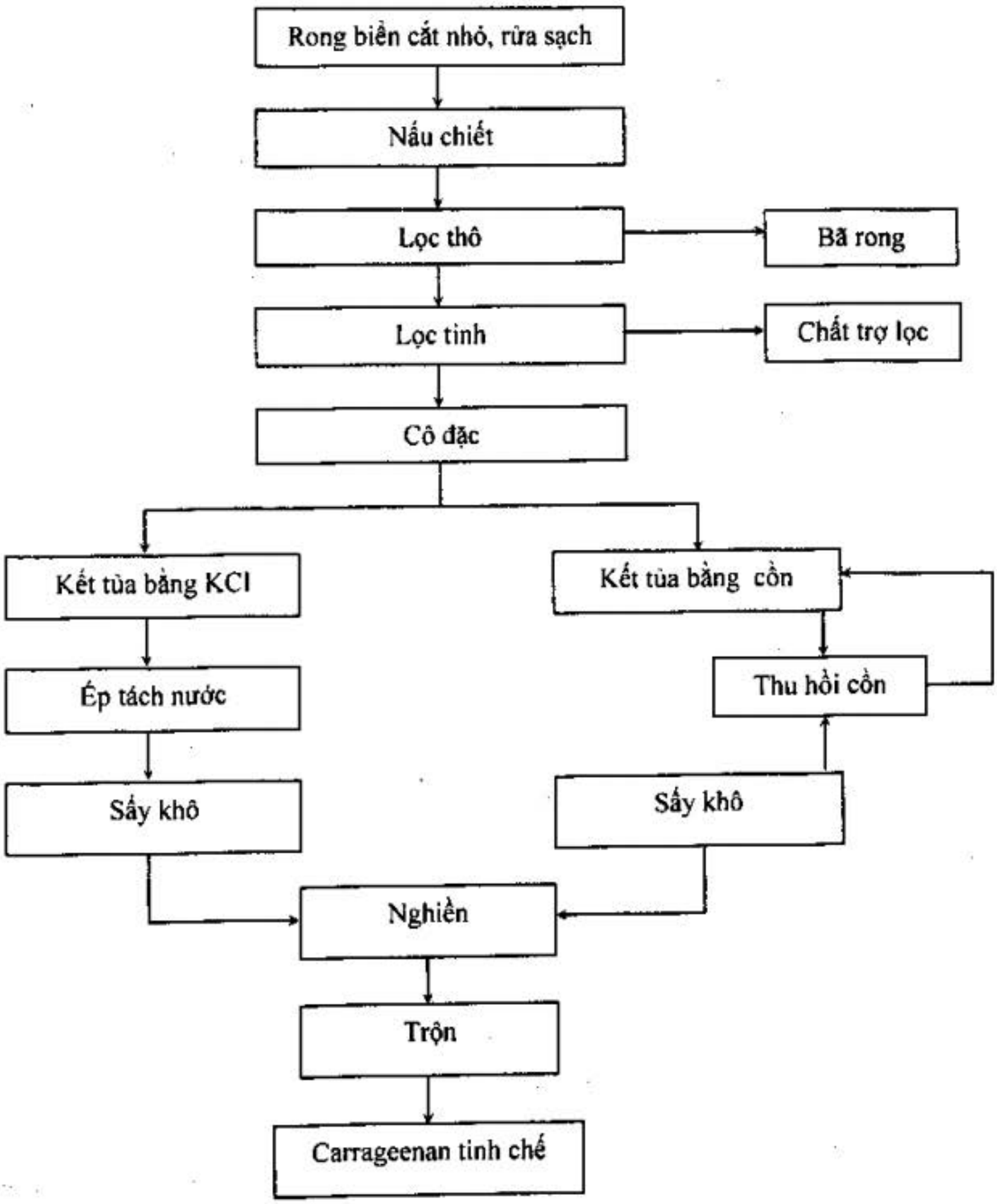
Phương pháp gel dựa trên khả năng tạo gel của kappa carageenan với muối kali. Gel có thể được tạo thành bằng nhiều cách. Đối với công nghệ làm đông – tan giá, gel được tạo thành dạng sợi bằng cách ép dung dịch carrageenan qua các lỗ nhỏ vào dung dịch KCl. Các sợi thu được mang rửa với nhiều KCl hơn để lấy nước ra thêm, sau đó ép để lấy bớt chất lỏng ra và đem đông lạnh. Khi tan giá, nước thoát ra do hiện tượng rỉ nước (syneresis), sợi được rửa với KCl, cắt nhỏ, sấy khô. Sản phẩm này tất nhiên chứa nhiều KCl. Một phương pháp khác thay cho cấp đông – tan giá là ép tách nước như trường hợp agar. Sau khi ép nhiều giờ, tấm gel được cắt nhỏ, sấy khô và nghiền đến kích thước cần thiết.

Carrageenan bán tinh chế SRC (semi-refined carrageenan).

Để sản xuất SRC, người ta dùng rong *Kappaphycus alvarezii* chứa trong các giỏ kim loại, cho vào nồi nấu chứa dung dịch kiềm KOH trong 2 giờ. Gốc OH thấm vào cây rong và khử gốc sulfate, làm tăng các gốc 3,6 anhydride và do đó tăng độ bền gel. Ion kali tương tác với carrageenan tạo gel làm cho nó không tan trong dung dịch nóng. Trong quá trình này, các loại protein hoà tan, carbohydrate và muối tan vào nước nóng và do đó được lấy ra khỏi cây rong. Phần rắn vẫn giữ nguyên hình dạng cây rong được lấy ra, rửa

nhiều lần để loại kiềm và các tạp chất còn bám trên thân rong. Sau đó nó được phơi khô, cắt nhỏ và nghiền thành bột.

Sản phẩm thu được không trắng, có nhiều vi sinh vật và không phù hợp cho con người nên được dùng làm thức ăn cho vật nuôi. Khi thanh trùng các vi sinh vật sẽ chết nên lượng vi sinh khôrg quan trọng. Sản phẩm này chỉ cần cắt nhỏ để bán cho các nhà máy sản xuất carrageenan tinh chế dùng làm nguyên liệu.



Hình 6.4 Sơ đồ công nghệ tách chiết carrageenan (Mc.Hugh 1987)

5. Ứng dụng

Trước khi nói đến các ứng dụng cần nhắc lại các tính chất cơ bản của carrageenan từ đó đưa đến các áp dụng khác nhau.

Cả hai loại kappa và iota carrageenan đều tạo gel với muối kali và canxi. Dung dịch nước của cả hai loại phải được nung nóng lên 60^0C để hoà tan carrageenan, sau khi cho muối vào, làm nguội để tạo gel. Đối với kappa, chỉ cần 0,5% trong nước và 0,2% trong sữa đủ để tạo gel.

Kappa tạo gel chắc nhất với muối kali, sau đó là canxi. Gel với kali chắc, đàn hồi trong khi gel với canxi cứng và dòn. Kappa cho gel chắc nhất trong các loại carrageenan nhưng dễ bị ri nước ra khỏi gel. Nếu trộn iota và lambda chung với kappa, hiện tượng ri nước ít hơn nhưng cũng làm giảm độ cứng và độ dòn.

Iota tạo gel chắc với canxi, theo sau là kali, ngược với kappa. Gel canxi mềm, dẻo dai và thực tế xem như không bị rỉ nước. Quá trình làm đông –tan giá không phá huỷ gel. Nó có tính chất bất thường của một gel, đó là tính chảy thixotropic. Điều này có nghĩa là khi khuấy nó chảy như chất lỏng nhưng khi để yên, nó tạo lại thành gel.

Tính chất thixotropic tương tự đối với gel kappa trong sữa. Gel yếu được tạo thành có thể chảy khi khuấy. Gel yếu này đủ tạo thành mạng lưới để treo các hạt rắn pha vào sữa ví dụ như chocolate.

Carrageenan mang điện tích âm nên có thể liên kết với protein mang điện tích dương hay các phần của protein mang điện tích dương. Do đó carrageenan có thể liên kết với casein trong sữa để tạo thành mạng lưới gel ba chiều.

Các sản phẩm sữa

Ứng dụng quan trọng nhất của carrageenan là trong công nghiệp sữa.

Chỉ cần pha một lượng nhỏ, 0,01-0,05% vào các sản phẩm sữa. Ví dụ trong công nghệ làm phô mai, chỉ cần 0,01-0,04% đủ để làm phô mai tránh được hiện tượng tách váng sữa. Tương tự khi làm kem cũng ngăn hiện tượng tách váng sữa khi thêm các chất để cải thiện cơ tính và sự phát triển tinh thể nước đá. Bột cacao có thể treo lơ lửng trong sữa khi có kapppa do tạo gel yếu. Bột chocolate hoà tan vào nước hay sữa, khi có mặt lambda có thể cải thiện tính ổn định và cảm giác khi uống.

Lambda hay hỗn hợp các loại carrageenan có thể làm cho cà phê sữa tránh tách chất béo. Lambda hay kappa có thể làm ổn định hệ bọt của kem và làm nó trắng ra khi đánh kem.

Các thực phẩm có nền là nước

Trong bối cảnh các bệnh bò điên và bệnh chân miệng trên heo phát triển thành dịch, việc sử dụng gelatin bị hạn chế và gây nghi ngại cho người tiêu dùng. Trong bối cảnh đó, việc sử dụng carrageenan ngày càng mang lại nhiều hứa hẹn. Gelatin có nhiều ưu điểm như tan chảy trong miệng, tạo cảm giác mịn màng khi ăn, dễ giải phóng hương vị khi ăn. Tuy nhiên khi để ra ngoài trong đôi ba ngày, nó trở nên dai và không ngon miệng. Gel từ iota carrageenan có nhược điểm độ nóng chảy cao do đó khi ăn không mềm mại như gelatin. Nhưng ở khí hậu nóng nó không nóng chảy và không dai khi để ra ngoài. Khi trộn carrageenan với các chất như lotus bean gum, konjac hay tinh bột có thể cải thiện tính chất của gel carrageenan. Khi chế biến các loại thức ăn tráng miệng, ăn chay, carrageenan cùng với pectin có thể thay thế cho gelatin.

Các loại jelly thường dựa trên nền hàm lượng đường cao và pectin. Khi cần các sản phẩm như vậy với calori thấp hay không có calori, người ta dùng hỗn hợp kappa và iota. Đối với các loại nước uống trái cây ăn kiêng, có thể dùng lambda để tạo cảm giác tốt khi uống.

Các loại nước xốt trộn salat ít có dầu hoặc không có dầu có thể dùng iota hoặc kappa để treo ổn định các loại rau thơm trộn vào. Đối với các loại xốt mayonnaise giảm béo, cần có chất tạo độ quánh và ổn định nhũ tương dầu trong nước, khi đó kết hợp carrageenan và xanthan gum. Sự kết hợp của carrageenan với protein có thể dùng để làm trong bia.

Các sản phẩm thịt

Khi tiêm carrageenan vào thịt, nó sẽ tạo liên kết với nước và protein, do đó khi nấu, thịt ít bị mất nước, giữ được vẻ mềm mại. Thường tiêm dung dịch carrageenan với nước muối hay polyphosphate.

Khi chế biến thịt ít chất béo, thường làm mất độ mềm mại và tạo cảm giác khô khi ăn. Do đó người ta dùng các keo ưa nước để cải thiện tính chất. Thường dùng kappa carrageenan và muối phosphate. Các loại bánh hamburger cũng dùng carrageenan để tạo cảm giác thay chất béo trong thịt.

Carrageenan còn dùng trong thức ăn vật nuôi. Đây là một ứng dụng rất lớn của carrageenan bán tinh chế SRC với sản lượng 5500 tấn /năm. Nó là chất tạo quánh và kết dính các thành phần của thức ăn của vật nuôi.

Carrageenan còn dùng trong các gel tạo mùi thơm cho phòng, tủ lạnh hay xe hơi. Dùng trong kem đánh răng để tạo độ quánh.

Trong công nghệ sinh học, carrageenan được dùng tạo gel cố định tế bào như alginat.

PHẦN 3: CÁC POLYMER SINH HỌC BIỂN CÓ NGUỒN GỐC ĐỘNG VẬT

CHƯƠNG 7

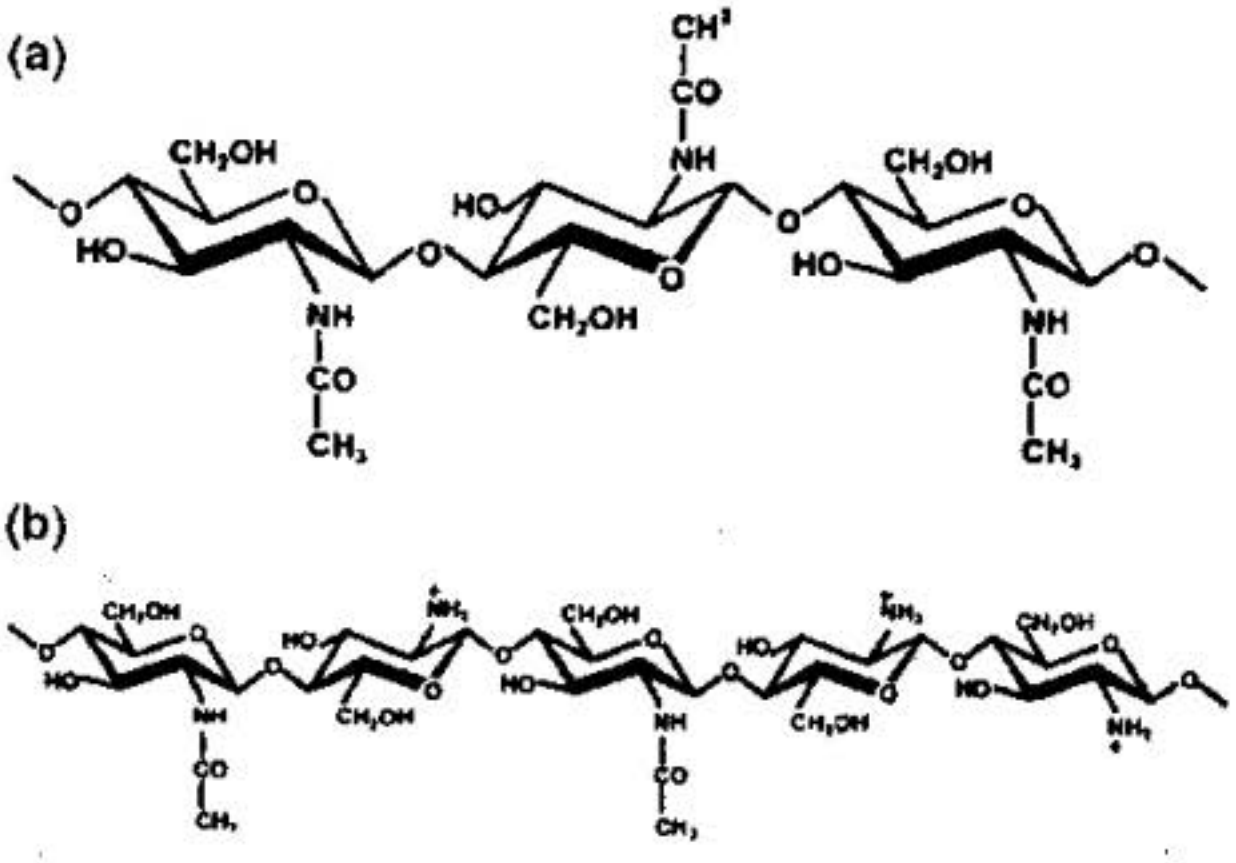
CHITIN – CHITOSAN

1. Sơ lược lịch sử, thuật ngữ

Chitin có cấu trúc hoá học giống cellulose và có thể xem là một dẫn xuất của cellulose với nhóm acetamido ở cacbon số 2. Chitin đóng vai trò là thành phần tạo nên độ cứng chắc của thành tế bào của nấm và vỏ của giáp xác. Chitin phân bố rộng rãi trong lớp vỏ của sâu bọ và giáp xác và nó cũng được tìm thấy ở vi sinh vật. Chitin được tách chiết lần đầu tiên vào năm 1811 bởi nhà dược hoá học người Pháp Henri Braconnot từ nấm (Braconnot, 1811). Chitosan là dẫn xuất của chitin sau khi tách nhóm acetyl nên chitosan có các nhóm amino.

a) Cấu trúc hoá học

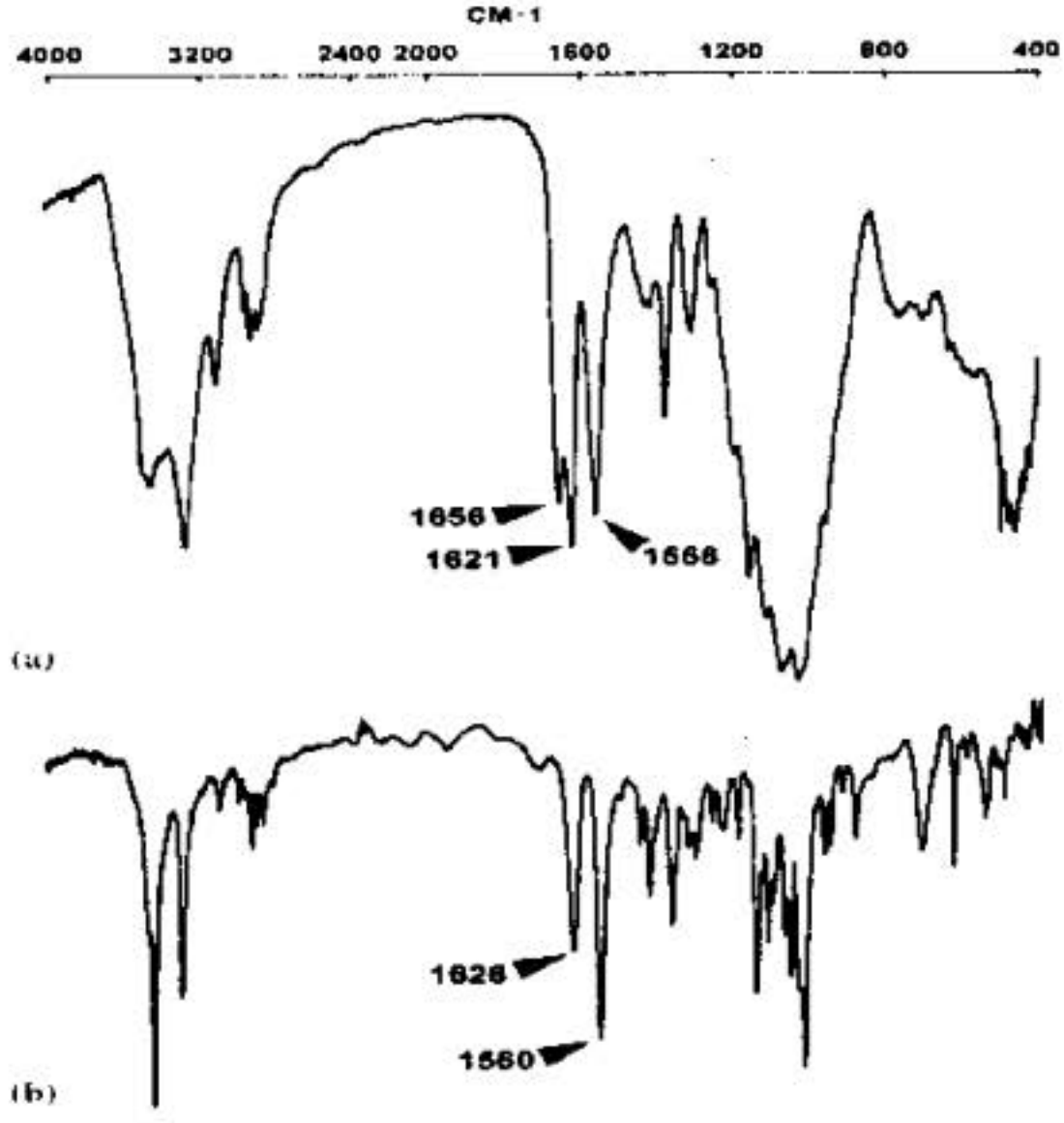
Chitin là polymer hữu cơ phổ biến trong tự nhiên sau cellulose. Chitin ít khi ở dạng tự do mà luôn liên kết với protein dưới dạng phức hợp, cacbonat canxi và nhiều hợp chất hữu cơ khác, gây khó khăn cho việc tách chiết. Chitin là một polysaccharide được cấu tạo bởi các monosaccharide liên kết với nhau bằng cầu nối 1,4 – glucoside, có công thức phân tử là $(C_8H_{13}O_5N)_n$.



Hình 7.1 Cấu trúc hoá học của chitin (a) và chitosan (b) (Einbu, 2007)

Người ta chia cấu trúc chitin thành ba dạng α-chitin, β-chitin, γ-chitin. Cấu trúc của chitin ở các dạng trên xuất phát từ nguồn chiết rút chitin, chitin từ tôm và cua có dạng α-chitin, còn chitin từ mực có dạng β-chitin. Ba dạng chitin nêu trên có sự khác nhau về tính hydrat hoá, kích thước của mỗi đơn vị cấu trúc và số mạch chitin trong mỗi đơn vị cấu trúc. α-chitin có độ rắn phân tử cao nhất và ở dạng rắn chắc và các mạch chitin sắp xếp song song nhưng ngược chiều nhau. β-chitin bao gồm các mạch chitin song song cùng chiều nhau, có độ rắn thấp, tính hydrat hoá cao. γ-chitin sắp xếp cứ 2 mạch song song cùng chiều thì có một mạch ngược chiều. Trong tự nhiên, α-chitin có mặt nhiều nhất và thường rất cứng. Trong khi β-chitin, γ-chitin thì tạo nên tính dai, dẻo.

Hình 7.2 Sự sắp xếp của chuỗi polymer của α-chitin, β-chitin, γ-chitin

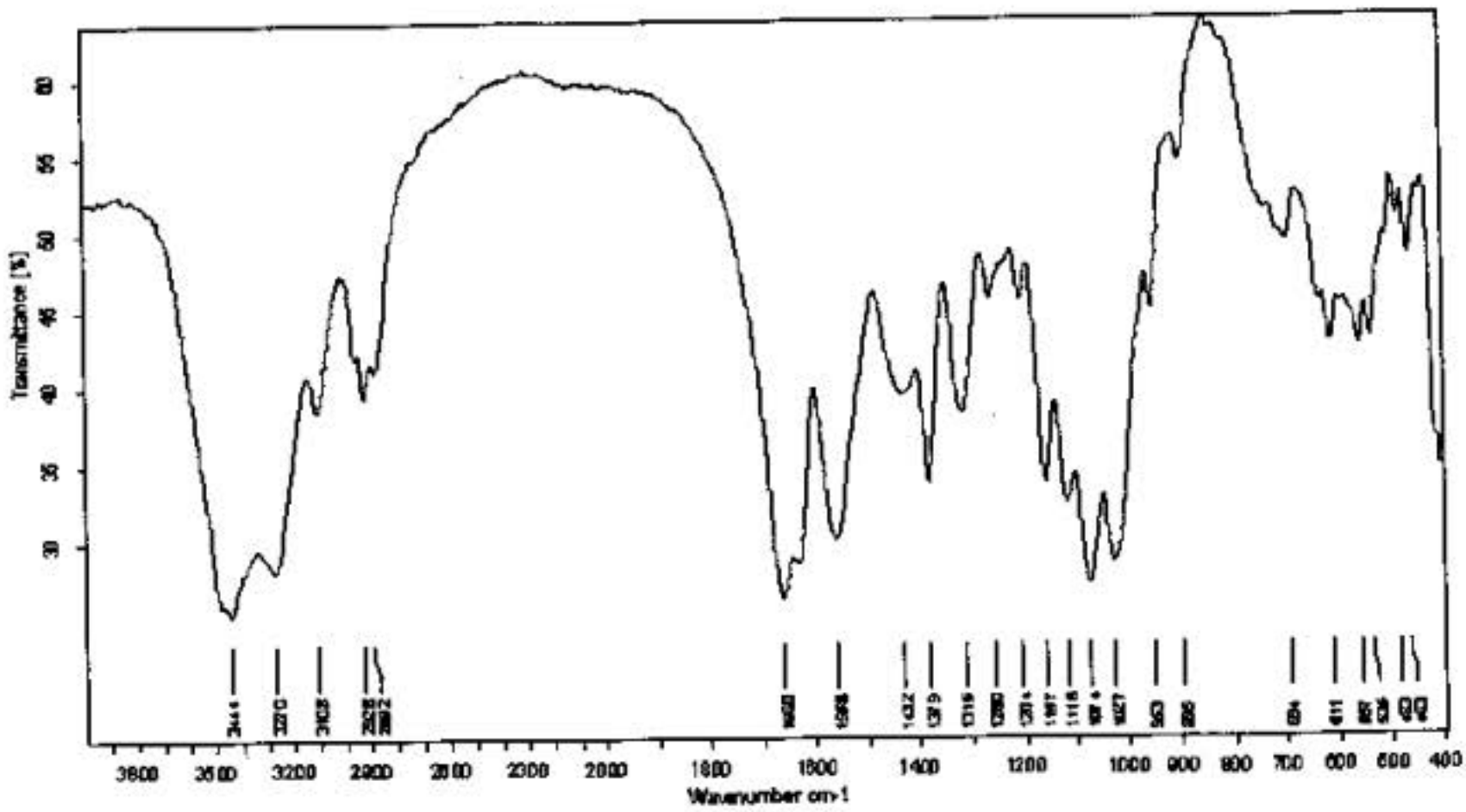


Hình 7.3 Phổ FTIR của α-chitin (a) và β-chitin (b) (Rinaudo, 2006)

Phổ IR của α-chitin và β-chitin rất điển hình với các dải hấp thụ rất nhọn. Dải hấp thụ của C=O nằm trong vùng 1600 đến 1500 cm^{-1} và khác nhau đối với hai loại chitin. Đối với α-chitin, dải amid I tách ra thành hai ở các sóng

1656 và 1621 cm^{-1} trong khi ở β-chitin nằm ở 1626 cm^{-1}. Ngược lại amid II chỉ có một dải hấp thụ cho cả hai loại: 1556 cm^{-1} cho α-chitin và 1560 cm^{-1} cho β-chitin. Việc tách thành hai dải hấp thụ của amid I vẫn còn là một vấn đề còn bàn cãi. Dải 1656 cm^{-1} xuất hiện tại bước sóng tương tự như của polyamid và protein. Nó là dải hấp thụ của hydro trong C=O liên kết với N-H của mạch phân tử lân cận.

Dải sóng 1621 cm^{-1} không có trong polyamid và protein có thể do liên kết hydro của C=O với nhóm hydroxymethyl của gốc chitin tiếp theo trong cùng mạch phân tử. Thêm vào đó, dải 1621 cm^{-1} bị lệch đi trong nước nặng (Deuterated water) trong khi dải 1656 cm^{-1} giữ không đổi. Sự thiếu các định nghĩa chính xác về cấu trúc phân tử của chitin và các liên kết hydro giữa các lớp chitin không cho phép giải thích chính xác dải sóng này. Phổ IR cho phép tính được độ deacetyl hoá của chitin nhưng phương pháp này có sai số lớn.

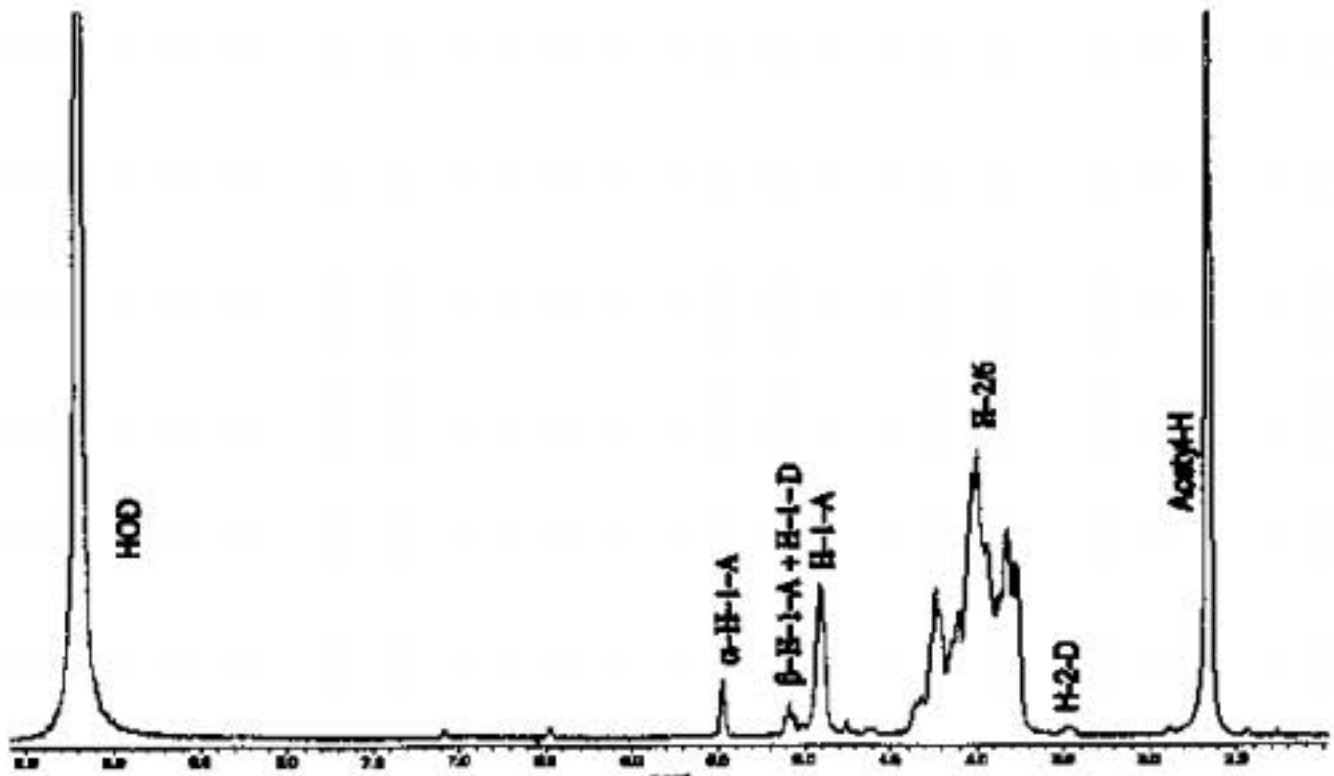


Hình 7.4 Phổ FTIR của chitin từ tôm thẻ chân trắng (Trung, 2011)

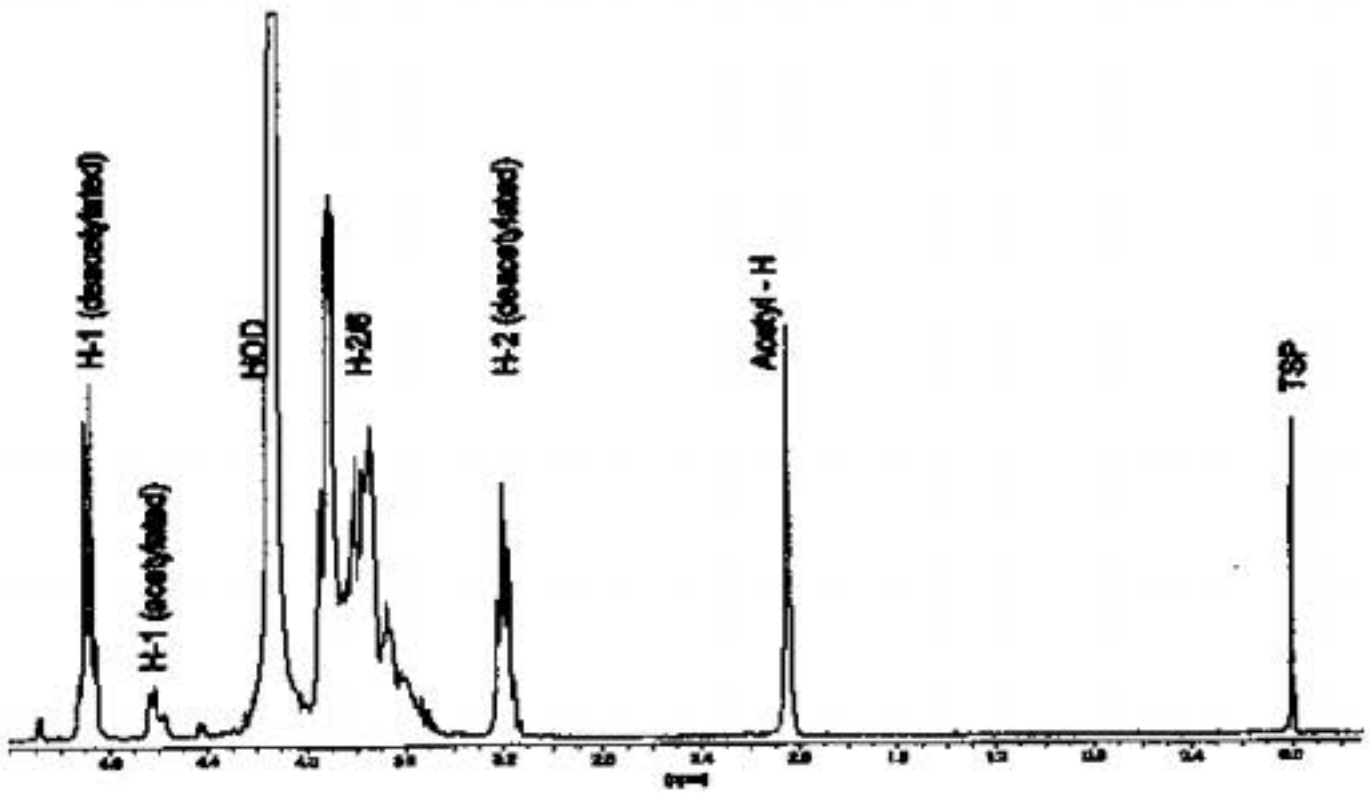
Cấu trúc của chitin có thể được hiểu rõ hơn khi nghiên cứu phổ NMR. Khi hoà tan chitin trong DCl có thuận lợi so với khi hoà tan trong nước là không bị gốc HDO che lấp bất kì proton nào. Phổ cho thấy các mũi cộng hưởng của các proton của vùng anome (nối với C1) với α acetyl và β anome ở các vị trí 5,43 và 5,05 ppm. H-1 của các gốc N acetyl bên trong mạch cộng hưởng ở vị trí 5,07 ppm, chồng lên mũi proton β anome. Phổ NMR cho biết các tín hiệu của proton H-1 là $I_{\alpha H1A}$, $I_{\beta H1A}$ và I_{H1A}. Tín hiệu của gốc deacetyl là I_{H2D}. Như vậy ta có thể suy ra công thức tính thành phần gốc acetyl hoá như sau:

$$F_A = \frac{\left(I_{\alpha H1A} + I_{\beta H1A} + I_{H1A}\right) - I_{H2D}}{\left(I_{\alpha H1A} + I_{\beta H1A} + I_{H1A}\right)} \qquad (7.1)$$

Dễ thấy rằng trên phổ chitosan, mũi cộng hưởng H-2 deacetyl hoá có cường độ cao hơn trong phổ chitin và mũi H-1A thì giảm đi nhiều. Như vậy phổ NMR là một công cụ mạnh để nghiên cứu cấu trúc chitin/chitosan và động học của quá trình deacetyl hoá.



Hình 7.5 Phổ proton 1H NMR của chitin hoà tan trong DCl. Máy Bruker 500 (Thắng, 2011)



Hình 7.6 Phổ proton 1H NMR của chitosan. Máy Bruker 500 (Thắng, 2011)

2. Tính chất

a) Chitin

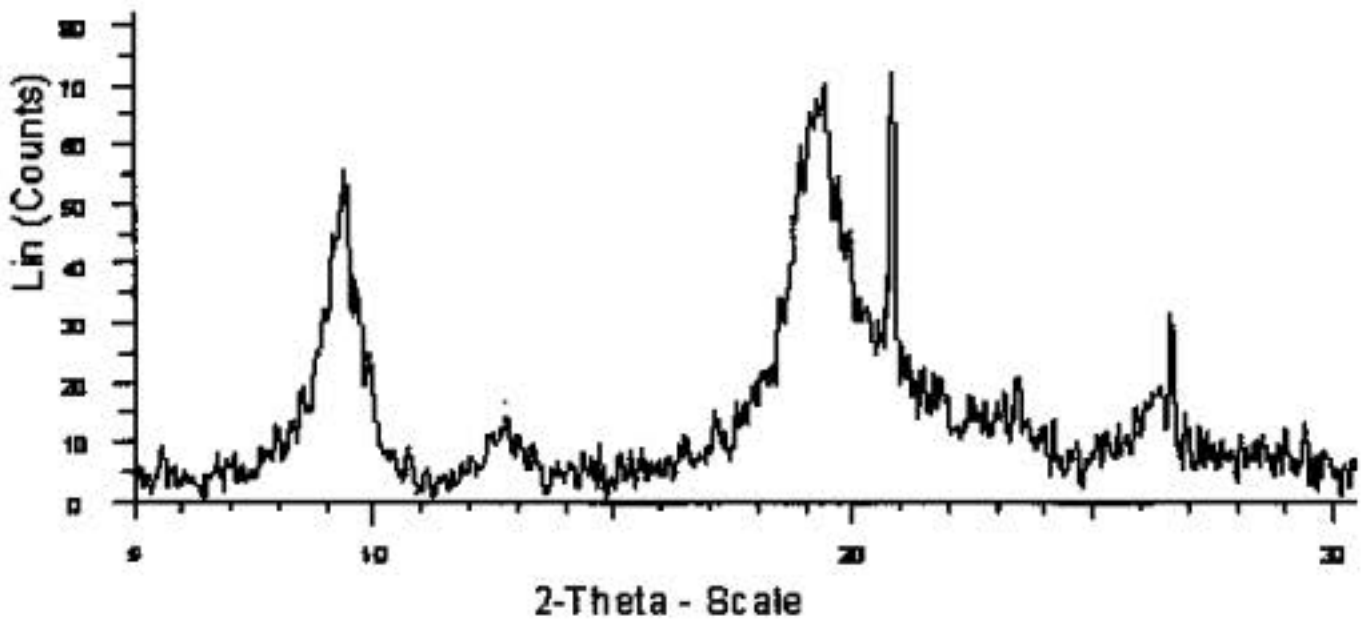
Chitin có màu trắng, cũng giống cellulose, chitin có tính kị nước cao (đặc biệt đối với α-chitin) và không tan trong nước, trong kiềm, trong acid loãng và các dung môi hữu cơ như ete, rượu. Tính không tan của chitin là do chitin có cấu trúc chặt chẽ, có liên kết trong và liên phân tử mạnh thông qua các nhóm hydroxyl và acetamide (Urbanczyk và cộng sự, 1997). Tuy nhiên, cần lưu ý là β-chitin, không giống như α-chitin, có tính trương nở với nước cao.

– Chitin hoà tan được trong dung dịch acid đậm đặc như HCl, H_3PO_4 và dimethylacetamide chứa 5% lithium chloride.

– Chitin tự nhiên có độ deacetyl dao động trong khoảng từ 8-12%, phân tử lượng trung bình lớn hơn 1 triệu Dalton. Tuy nhiên, chitin chiết rút từ vi sinh vật thì có phân tử lượng thấp, chỉ khoảng vài chục ngàn Dalton. Khi đun nóng chitin trong dung dịch NaOH đặc thì chitin bị khử mất gốc acetyl tạo thành chitosan.

– Khi đun nóng chitin trong dung dịch HCl đặc thì chitin sẽ bị thuỷ phân tạo thành các phân tử glucosamin có hoạt tính sinh học cao.

– Độ rắn (crystallinity) của chitin cao và biến đổi tuỳ theo từng loại chitin.



Hình 7.7 Phổ nhiễu xạ tia X của chitin từ tôm thẻ chân trắng (Trung, 2011)

Phổ nhiễu xạ tia X của của α-chitin từ vỏ tôm (a) và β-chitin từ xương mực cho thấy ở mẫu α-chitin có vòng nhiễu xạ mạnh, ở vòng trong thì không có tính hydrat hoá mạnh. Trong khi ở mẫu β-chitin thì có vòng tương tự nhưng có vòng nhiễu xạ yếu hơn, và có tính hydrat hoá mạnh. Ngoài ra, để hiểu rõ cấu trúc về sự sắp xếp của các mạch chitin và các liên kết hydro, người ta có nghiên cứu về cấu trúc tinh thể của chitin.

b) Chitosan

Chitosan là một amino polysaccharide, được hình thành từ quá trình deacetyl hoá chitin. Chitosan được phát hiện lần đầu tiên bởi Rouget vào năm 1859. Chitosan thường ở dạng vẩy hoặc dạng bột có màu trắng ngà. Công thức cấu tạo của chitosan gần giống như chitin và cellulose, chỉ khác là chitosan chứa nhóm amin ở C thứ 2. Không giống như chitin chỉ tan trong một số ít hệ dung môi, chitosan tan tốt trong các acid hữu cơ thông thường như acid formic, acid acetic, acid propionic, acid citric, acid lactic. pKa của chitosan có giá trị từ 6,2 đến 6,8. Khi hoà tan chitosan trong môi trường acid loãng tạo thành keo dương. Đây là một điểm rất đặc biệt vì đa số các keo polysaccharide tự nhiên tích điện âm. Chitosan tích điện dương sẽ có khả năng bám dính bề mặt các ion tích điện âm và có khả năng tạo phức với các ion kim loại và tương tác tốt với các polymer tích điện âm. Một số dung môi thường sử dụng để hoà tan chitosan được trình bày ở Bảng 7.1. Chitosan không hoà tan trong nước, kiềm, cồn.

Bảng 7.1 Các dung môi thường sử dụng để hoà tan chitosan

Dung môi	*Nồng độ thường sử dụng (%)*
Acid acetic	1-2
Acid formic	1-2
Acid lactic	1-2
Acid propionic	1-2
Acid HCl	0,25-0,5
Acid citric	5-10
Acid glutamic	1-3%
Acid ascorbic	1-2%

Độ deacetyl của chitosan

Độ deacetyl của chitosan là một thông số quan trọng, đặc trưng cho tỉ lệ giữa 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose với 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose trong phân tử chitosan. Tính chất của chitosan như khả năng hút nước, khả năng hấp phụ chất màu, kim loại, kết dính với chất béo, kháng khuẩn, kháng nấm, mang DNA ...phụ thuộc rất lớn vào độ deacetyl hoá. Chitosan có độ deacetyl cao thì có khả năng hấp phụ chất màu, tạo phức với kim loại tốt hơn. Tương tự, khả năng kháng khuẩn, kháng nấm của chitosan cao hơn ở các mẫu chitosan có độ deacetyl cao. Cụ thể, khả năng kháng

khuẩn tốt đối với chitosan có độ deacetyl trên 90%. Tuy nhiên, chitosan khả năng hút nước của chitosan thì giảm đi khi tăng độ deacetyl. Kết quả nghiên cứu của Trung và cộng sự (2006) cho thấy khả năng hút nước của chitosan có độ deacetyl hoá thấp (75%) đạt đến 659% cao hơn nhiều so với chitosan có độ deacetyl hoá cao chỉ đạt 486% (Bảng 7.2).

Bảng 7.2 Tính chất của chitosan có độ DD khác nhau (Trung và cộng sự, 2006)

Tính chất	*Chitosan với độ deacetyl khác nhau*		
	75%	87%	96%
Độ nhớt (cP)	111,2 ± 9,5	103,4 ± 7,9	107,3 ± 9,6
Tính thấm nước (%)	659 ± 33	472 ± 35	486 ± 29
Độ tan (%)	99,4 ± 0,1	99,6 ± 0, 3	99,5 ± 0,2

Ngoài độ deacetyl thì sự phân bố của các nhóm glucosamin cũng ảnh hưởng đến tính chất của chitosan. Cụ thể, chitosan phân bố dạng ngẫu nhiên thì dễ tan hơn chitosan phân bố dạng khối.

D-D-A-D-D-A-A-D-D-D-A-D-D-A-D-D-A-A-

Phân bố dạng ngẫu nhiên của phân tử chitosan

D-D-D-D-D-D-D-D-D-A-A-A-A-A-A-A-A-

Phân bố dạng block (dạng khối) của phân tử chitosan

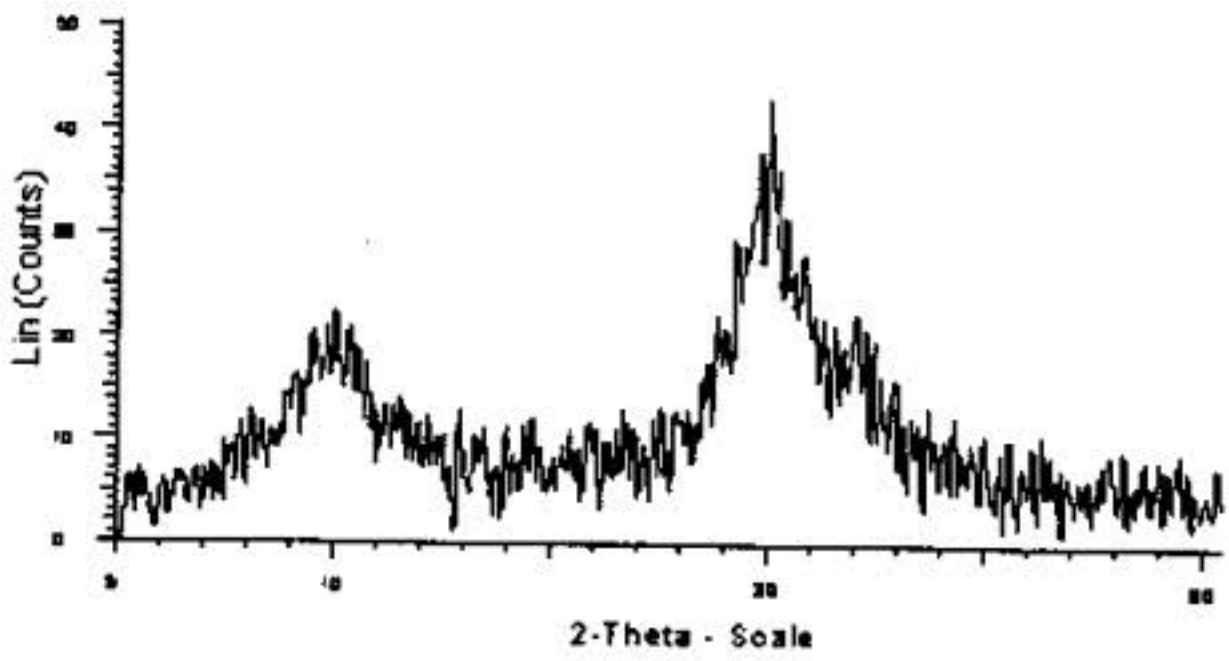
Phân tử lượng và độ nhớt của chitosan

Phân tử lượng của chitosan cũng là một thông số quan trọng, nó quyết định tính chất của chitosan như khả năng kết dính, tạo màng, tạo gel, khả năng hấp phụ chất màu, đặc biệt là khả năng ức chế vi sinh vật. Chitosan có phân tử lượng càng lớn thì có độ nhớt càng cao. Tuy nhiên, chitosan có phân tử lượng thấp thì thường có hoạt tính sinh học cao hơn, thường có nhiều ứng dụng trong nông nghiệp, y học và công nghệ sinh học. Chitosan có phân tử lượng lớn có khả năng tạo màng tốt và màng chitosan tạo thành có sức căng tốt. Thông thường, phân tử lượng của chitosan nằm trong khoảng từ 100 000 Dalton đến 1 200 000 Dalton (Li và cộng sự, 1997). Phân tử lượng của chitosan phụ thuộc vào nguồn chitin và điều kiện deacetyl và thường thì rất khó kiểm soát. Độ nhớt của chitosan phụ thuộc vào phân tử lượng. Chitosan

có phân tử lượng thấp có độ nhớt từ 30-200 cps và chitosan có phân tử lượng lớn hơn 1 triệu Dalton có độ nhớt lên đến 3000-4000 cps. Ngoài ra, độ nhớt của chitosan còn phụ thuộc vào độ deacetyl, cường độ ion, pH, nhiệt độ.

Độ rắn (crystallinity) của chitosan

Độ rắn của chitosan phụ thuộc vào nhiều yếu tố như nguồn gốc chitin, độ deacetyl hoá. phân tử lượng và quá trình xử lí chitin và chitosan. Độ rắn phân tử của chitosan được trình bày ở Hình 7.8.



Hình 7.8 Phổ nhiễu xạ tia X của chitosan từ tôm thẻ chân trắng (Trung, 2011)

Trên thị trường hiện nay có rất nhiều loại chitosan với tính chất và chất lượng rất khác nhau, thể hiện rất rõ ở hàm lượng protein, tro, độ deacetyl và độ nhớt.

Khả năng kháng khuẩn, kháng nấm của chitosan

Chitosan có khả năng ức chế nhiều chủng vi sinh vật: vi khuẩn Gram âm, vi khuẩn Gram dương và vi nấm. Khả năng ức chế vi sinh vật của chitosan phụ thuộc vào độ deacetyl, phân tử lượng. So với chitin, chitosan có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm tốt hơn vì chitosan tích điện dương ở vị trí C thứ 2 ở pH nhỏ hơn 6. Chitosan có độ deacetyl cao trên 85% thì có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm tốt. Chitosan có phân tử lượng dưới 2000 Dalton thì khả năng ức chế vi sinh vật kém. Chitosan có phân tử lượng trên 9000 Dalton thì có khả năng ức chế vi sinh vật cao (Jeon và cộng sự, 2000). Tuy nhiên, chitosan có phân tử lớn thì khả năng kháng khuẩn cũng thấp. Chitosan được hoà tan trong các dung môi hữu cơ như acid acetic, acid lactic và được sử dụng để xử lí kháng khuẩn, kháng nấm. Chitosan có khả năng ức chế *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula glutensis*, *Botrytis cinerea*,

Rhizopus stolonifer, Aspergillus niger. Nồng độ ức chế của chitosan phụ thuộc vào loại chitosan, loài vi sinh vật, điều kiện áp dụng và thường sử dụng trong khoảng 0,0075% đến 1,5%. Ngoài ra, các dẫn xuất của chitosan cũng có khả năng kháng nấm, kháng khuẩn tốt. N-carboxymethylchitosan ở nồng độ 0,1-5 mg/ml trong môi trường pH 5,4 làm giảm khả năng sinh độc tố aflatoxin của *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus* (Shahidi và cộng sự, 1999).

Khả năng tạo màng của chitosan

Chitosan có khả năng tạo màng rất tốt. Tính chất cơ lí của màng chitosan như độ chịu kéo, độ rắn, độ ngấm nước, phụ thuộc nhiều vào phân tử lượng và độ deacetyl hoá của chitosan. Chitosan độ deacetyl cao có ứng suất kéo và độ giãn dài giới hạn cao hơn màng chitosan độ deacetyl thấp, tuy nhiên chúng có độ trương nở thấp hơn. Ngoài ra, tính chất của màng chitosan phụ thuộc rất nhiều vào dung môi sử dụng hoà tan chitosan để tạo màng. Độ rắn (crystallinity) của màng chitosan cũng phụ thuộc vào dung môi sử dụng.

Bảng 7.3 Ảnh hưởng của hệ dung môi sử dụng đến ứng suất kéo, độ giãn dài giới hạn, độ trương nở của màng chitosan với độ deacetyl khác nhau (Trang Sĩ Trung, 2009)

Dung môi	Ứng suất kéo (N/mm^3)		Độ giãn dài giới hạn (%)		Độ trương nở (%)	
	Chitosan độ deacetyl thấp	Chitosan độ deacetyl cao	Chitosan độ deacetyl thấp	Chitosan độ deacetyl cao	Chitosan độ deacetyl thấp	Chitosan độ deacetyl cao
Acid formic	18,64	35,35	0,95	1,95	403,90	69,81
Acid acetic	27,91	40,53	0,84	1,70	359,00	65,69
Acid glycolic	18,78	35,71	0,88	2,50	450,39	97,35
Acid citric	24,80	36,55	1,85	3,50	437,24	7,54

Các tính chất khác của chitosan

Ngoài các tính chất nêu trên, chitosan còn có khả năng chống oxy hoá. Khả năng chống oxy hoá của chitosan cũng phụ thuộc vào độ deacetyl, phân tử lượng và độ nhớt của chitosan. Chitosan có độ nhớt thấp thì có khả năng chống oxy hoá cao. Hơn nữa, chitosan có thể gắn kết tốt với lipid, protein, các chất màu. Do chitosan không tan trong nước nên chitosan ổn định hơn trong môi trường nước so với các polymer tan trong nước như alginate, agar. Khả năng tạo phức, hấp phụ với lipid, protein và chất màu phụ thuộc nhiều vào phân tử lượng, độ deacetyl hoá, độ rắn và độ tinh khiết của

chitosan và thường biến động lớn với các mẫu chitosan (Bảng 7.4). Chitosan có độ deacetyl cao thì thường hấp phụ màu tốt.

Bảng 7.4 Khả năng hấp phụ chất màu, trương nở với nước và hấp phụ chất béo của một số loại chitosan thương mại (Cho và cộng sự, 1998)

Sản phẩm	Khả năng hấp phụ chất màu (%)	Khả năng trương nở với nước (%)	Khả năng hấp phụ chất béo (%)
1	80,0 ± 1,8	671 ± 37	446 ± 24
2	35,2 ± 1,7	458 ± 12	314 ± 6
3	40,8 ± 0,6	662 ± 16	444 ± 24
4	85,6 ± 1,4	506 ± 43	344 ± 7
5	72,8 ± 0,8	805 ± 6	535 ± 9

3. Tách chiết

Khác với các polymer khác, trong quá trình nấu chiết, người ta thường hoà tan polymer ra dung dịch rồi sau đó lọc, và tách dung môi để thu hồi dưới dạng răn. Chitin ngược lai, khi tách chiết, người ta lại làm ngược với các polymer trong thực vật là lấy tất cả các tạp chất ra khỏi vỏ giáp xác, phần còn lại sẽ là chitin. Cụ thể là người ta sẽ khử khoáng và protein, phần còn lại trong vỏ tôm cua là chitin. Chính điều này đã làm cho công nghệ sản xuất chitin đòi hỏi nhiều công sức. Việc làm tan khoáng không khó khăn trong khi làm cho protein tan ra khỏi lớp vỏ lại là một thách thức kĩ thuật do cấu trúc nhiều lớp đan xen giữa chitin và protein trong tự nhiên.

Chitin tồn tại trong nguyên liệu dưới dạng liên kết với protein, khoáng nên trong quá trình sản xuất chitin cần phải khử các hợp chất phi chitin này ra khỏi chitin. Các hợp chất phi chitin bao gồm protein, chất khoáng, chất màu, lipid và các hợp chất khác với hàm lượng biến đổi tuỳ theo loại nguyên liệu. Ví dụ: hàm lượng khoáng trong vỏ ghẹ thì cao và trong nang mực ống thì thấp. Việc khử các thành phần phi chitin để sản xuất chitin từ phế liệu thuỷ sản có thể thực hiện bằng phương pháp hoá học, phương pháp sinh học hoặc phương pháp kết hợp hoá học với sinh học. Tuy nhiên, hiện nay các quy trình sản xuất chitin ở quy mô lớn chủ yếu sử dụng phương pháp hoá học. Phương pháp hoá học có ưu điểm như nhanh, đơn giản, dễ thực hiện ở quy mô lớn. Tuy nhiên, phương pháp hoá học cũng có nhiều nhược điểm như sản phẩm chitin, chitosan có phân tử lượng thấp, độ nhớt thấp, dư lượng hoá chất lớn, ô nhiễm môi trường, ăn mòn thiết bị.

Quy trình sản xuất chitin thông thường gồm các công đoạn tách protein, tách khoáng, tẩy màu. Công đoạn tẩy màu ở các nước nhiệt đới như Việt Nam thường thực hiện kết hợp với quá trình phơi khô sản phẩm chitin.

Quá trình khử protein

Quá trình khử protein từ phế liệu thuỷ sản có thể thực hiện với nhiều hoá chất như NaOH, Na_2CO_3, $NaHCO_3$, KOH, K_2CO_3, $Ca(OH)_2$ hoặc có thể sử dụng vi sinh học hoặc enzyme. Một số điều kiện xử lí khử protein đối với các nguồn nguyên liệu khác nhau được trình bày ở Bảng 7.5. Tuỳ theo tính chất của nguyên liệu mà chúng ta có chế chọn chế độ để khử protein phù hợp.

Bảng 7.5 Các điều kiện để khử protein trong quá trình sản xuất chitin từ các nguồn phế liệu khác nhau (No và Mayers, 1997)

Nguồn	Chế độ khử protein				
	Nồng độ Kiềm		Nhiệt độ (^{0}C)	Thời gian (h)	Tỉ lệ (w/v)
Tôm hùm	1N	NaOH	100	12x5	1:5.5
	10%	NaOH	Nhiệt độ phòng	72	-
	10%	NaOH	100	2,5	1:50
	15%	NaOH	65	3	1:10
Tôm	3%	NaOH	100	1	-
	1%	NaOH	65	1	1:10
	1%	KOH	90	2	1:20
	4%	NaOH	Đun sôi	1	-
	1N	NaOH	100	1	1:6
	5N	NaOH	100	1	-
Tôm thẻ	5%	NaOH	Hồi lưu	2	1:15 – 20
	5%	NaOH	100	0,5	1:1
	0.5%	NaOH	Đun sôi	0,5	2:3
	15%	NaOH	65	3	1:10
Cua	1N	NaOH	80	3 (lặp lại 2 lần)	-
	2%	KOH	90	2	1:20
	1N	NaOH	50	6	-
	5%	NaOH	90	2	-
	1N	NaOH	60	5	-
	5%	NaOH	65	1	1:15

Đối với quá trình khử loại protein, nhiệt độ đóng vai trò quan trọng, ở nhiệt độ thường, quá trình tách protein diễn ra chậm, thời gian thuỷ phân từ một ngày đến vài ngày. Khi nâng nhiệt độ xử lí thì thời gian cần thiết để tách protein giảm đáng kể. Để rút ngắn thời gian tách protein chỉ còn vài giờ thì nhiệt độ cần đạt khoảng 90-100°C (Bảng 7.5). Ngoài ra, tỉ lệ giữa phế liệu với dung dịch hoá chất cũng đóng vai trò quan trọng quyết định hiệu quả của quá trình tách protein. Để tăng hiệu quả tách protein, trong nhiều nghiên cứu quá trình tách protein được lập lại nhiều lần.

Tuy nhiên, cần phải lưu ý là sử dụng nhiệt độ cao hoặc thời gian xử lí dài sẽ dẫn đến quá trình cắt mạch của sản phẩm chitin. Nồng độ kiềm sử dụng ảnh hưởng đến chất lượng chitin và chitosan thu được. Nồng độ cao thì khả năng thuỷ phân protein cao, thời gian xử lí ngắn, hàm lượng protein còn lại trong sản phẩm chitin thấp. Tuy nhiên, gây ra hiện tượng cắt mạch chitin và chitosan. Thông thường nồng độ kiềm sử dụng là 4%. Tỉ lệ giữa dung dịch kiềm và phế liệu cũng ảnh hưởng lớn đến hiệu quả tách protein, tỉ lệ 5/1 đối với nguyên liệu tươi và 15/1 đối với nguyên liệu khô thường được sử dụng. Để tăng cường hiệu quả của quá trình tách protein thì trong quá trình xử lí cần thực hiện khuấy đảo. Ngoài ra, kích thước của nguyên liệu cũng ảnh hưởng đến hiệu quả tách protein, do đó trong rất nhiều quy trình sản xuất chitin, phế liệu tôm được nghiền nhỏ đến kích thước từ 2-5 mm. Để đáp ứng yêu cầu chất lượng của chitosan công nghiệp, thì hàm lượng protein còn lại trong sản phẩm chitin phải nhỏ hơn 1%.

Quá trình khử khoáng

Phế liệu thuỷ sản (tôm, cua) thường chứa một lượng khoáng khá cao (chủ yếu là muối canxi cacbonat và một ít canxi photphat). Vì vậy, một trong những công đoạn quan trọng trong quy trình sản xuất chitin là khử khoáng. Quá trình khử khoáng có thể thực hiện bằng cách xử lí với các hoá chất sau: HCl, HNO_3, H_2SO_4. Tuy nhiên, thông thường quá trình khử khoáng được thực hiện trong dung dịch HCl loãng ở nhiệt độ phòng. Tương tự như quá trình khử protein, theo các công trình nghiên cứu đã công bố, chế độ khử khoáng cũng rất đa dạng, nồng độ HCl từ 0,5 N đến 2 N, nhiệt độ từ nhiệt độ rất thấp đến nhiệt độ phòng. Thời gian từ 0,5 giờ đến 48 giờ.

Động học phản ứng của quá trình khử khoáng diễn ra rất nhanh ở thời gian đầu (trong vòng 30 phút) với hàm lượng khoáng giảm đến 90%, sau đó quá trình diễn ra rất chậm. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của No và cộng sự (1989) và Percot và cộng sự (2003). Theo kết quả nghiên cứu của Percot, sau 30 giây, 98% lượng acid HCl cho vào đã phản ứng thể hiện quá trình khử khoáng diễn ra rất nhanh ở giai đoạn đầu. Ngoài ra, khi thực hiện công đoạn khử khoáng cần lưu ý đến tỉ lệ giữa nguyên liệu/acid vì nó ảnh hưởng quyết định đến hiệu quả khử khoáng. Tỉ lệ nguyên

liệu trên dung dịch acid tương ứng 1:15 là tốt nhất khi nồng độ acid sử dụng là 4%. Trong quá trình ngâm acid thường thực hiện ở nhiệt độ thường, kết hợp với khuấy đảo, quá trình khử khoáng chưa đạt nếu vỏ còn cứng và không thấy bọt khí nổi lên, cần bổ sung thêm acid.

Tuỳ theo từng loại nguyên liệu và yêu cầu chất lượng của chitin mà chế độ khử khoáng áp dụng khác nhau (Bảng 7.6). Thông thường đối với phế liệu tôm thì nồng độ HCl sử dụng thấp hơn, khoảng 4-5%, so với xử lí phế liệu cua, ghẹ có thể xử lí lên đến 10%, hoặc khử khoáng nhiều lần.

Bảng 7.6 Các điều kiện để khử khoáng trong quá trình sản xuất chitin từ các nguồn phế liệu khác nhau (No và Mayers, 1997)

Nguồn	Chế độ khử khoáng			
	Nồng độ HCl	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (h)	Tỉ lệ (w/v)
Tôm hùm	2N	Nhiệt độ phòng	5	1:9
	2N	Lạnh	48	1:5.5
	37%	-20	4	-
	90% formic	Nhiệt độ phòng	18	1:10
	1N	Nhiệt độ phòng	2	1:15
Tôm Sú	1N	Nhiệt độ phòng	0,5	1:3
	0,5N	Nhiệt độ phòng	-	1:11
	2,5%	20	1	1:10
	5%	Nhiệt độ phòng	-	-
	8%	30	8	1:10
	0,75N	Nhiệt độ phòng	0,5	1:12
	1,25N	Nhiệt độ phòng	0,5	1:12
	1,75N acetic	25	12	1:15
	6N	Nhiệt độ phòng	1	-
Tôm thẻ	5%	Nhiệt độ phòng	2	1:15 – 20
	5%	Nhiệt độ phòng	1	1:2
	1,25N	Nhiệt độ phòng	1	-
	1N	Nhiệt độ phòng	2	1:15
Cua, ghẹ	1N	Nhiệt độ phòng	12 (lặp lại 2 lần)	-
	2,5%	20	1	1:10
	1N	20	3	-
	5%	Nhiệt độ phòng	24	-
	0,1N	Nhiệt độ phòng	-	
	1N	Nhiệt độ phòng	0,5	1:15

Trong quá trình khử khoáng thì thường xảy ra quá trình cắt mạch chitin nên quá trình tách khoáng chỉ thực hiện ở nhiệt độ thường hoặc nhiệt độ thấp hơn để hạn chế quá trình đề polymer (Roberts, 1998). Ngoài ra, người ta có thể sử dụng EDTA để khử khoáng mà không ảnh hưởng nhiều đến mạch chitin. Tuy nhiên, việc ứng dụng EDTA để khử khoáng chỉ được thử nghiệm ở quy mô nhỏ, chưa được áp dụng trên quy mô công nghiệp vì EDTA là một hoá chất tương đối đắt tiền so với HCl. Gần đây, một số nghiên cứu đã ứng dụng các acid hữu cơ có nguồn gốc để tách khoáng như acid formic, acid acetic và acid lactic (Charoenvuttitham và cộng sự, 2006; Mahmoud và cộng sự, 2006). Ở các nghiên cứu này, nồng độ acid sử dụng từ khoảng dưới 1M đối với acid formic và acid lactic. Có thể sử dụng các acid này xử lí riêng hoặc kết hợp. Phương pháp sử dụng acid hữu cơ có nhiều ưu điểm hơn so với phương pháp sử dụng acid vô cơ như sản phẩm chitin và chitosan thu được có phân tử lượng lớn, độ tinh khiết cao và đây là phương pháp khử khoáng thân thiện hơn với môi trường.

Trong sản xuất chitin, việc thực hiện công đoạn khử khoáng sau khi tách protein thì sản phẩm chitin cuối cùng sẽ có hàm lượng khoáng còn lại thấp hơn so với sản phẩm chitin trong quy trình bắt đầu bằng công đoạn tách khoáng. Điều này có thể giải thích là HCl sẽ có tác dụng tốt hơn đối với mẫu phế liệu đã qua công đoạn tách protein, HCl sẽ tiếp xúc tốt hơn với các chất khoáng có trong phế liệu, hoà tan vào trong dung dịch. Tuy nhiên, sản phẩm chitosan sản xuất từ chitin của quy trình bắt đầu bằng công đoạn khử khoáng sau đó khử protein có độ nhớt cao hơn (Lertsutthiwong và cộng sự, 2002). Để nâng cao chất lượng chitin, người ta có thể tiến hành khử khoáng nhiều lần với nồng độ acid xử lí thấp. Để xác định chế độ xử lí khử khoáng phù hợp có thể dùng phương pháp thực nghiệm, kết hợp với tính toán dựa trên phương trình phản ứng hoá học. Sau công đoạn khử protein và khoáng, phế liệu được rửa sạch và chuyển sang công đoạn tẩy màu hoặc tiếp tục công đoạn deacetyl.

Quá trình tẩy màu

Trong phế liệu tôm và cua có chứa một lượng lớn các chất màu, chủ yếu thuộc nhóm carotenoid: astacene, astaxanthin, canthaxanthin, lutein và β-carotene. Việc liên kết của các chất màu này với các thành phần khác trong phế liệu như protein, khoáng, chitin vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ. Trong quá trình sản xuất chitin, để chitin có màu trắng đẹp thì cần có công đoạn tẩy màu. Việc tẩy màu này có thể thực hiện bằng cách phơi dưới ánh sáng mặt trời hoặc xử lí bằng các chất tẩy màu thông dụng như $KMnO_4$, H_2O_2, NaOCl, $NaHSO_3$. Thông thường H_2O_2 và NaOCl được sử dụng nhiều nhất. Một số dung môi để tẩy màu chitin và điều kiện xử lí được trình bày ở Bảng 7.7.

Tuy nhiên, quá trình tẩy màu thường đi kèm với quá trình cắt mạch chitin nên dẫn đến chitosan có phân tử lượng thấp, độ nhớt thấp. Vì vậy, chế độ tẩy màu cần phải được nghiên cứu lựa chọn phù hợp để hạn chế quá trình cắt mạch chitin. Quá trình tẩy màu cần tiến hành nhanh, sử dụng nồng độ thích hợp cho từng loại nguyên liệu. Thông thường quá trình tẩy màu chỉ sử dụng đối với phế liệu tôm vì hàm lượng sắc tố cao, còn đối với xương mực thì không cần thiết phải có bước tẩy màu.

Bảng 7.7 Điều kiện tẩy màu trong công nghệ sản xuất chitin (No và Meyers, 1997)

Nguồn phế liệu	Điều kiện tẩy màu			
	Dung môi	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Tỉ lệ
Tôm hùm	Ethanol + ether	Nhiệt độ phòng	Rửa nhanh	-
	NaOCl	Lạnh	-	-
	Acetone + NaOCl	Nhiệt độ phòng	15	1:10
Tôm	Acetone	-	-	-
	1% K_2MnO_4	Nhiệt độ phòng	60	-
Tôm thẻ	0,5%H_2O_2	Nhiệt độ phòng	Ngâm qua đêm	-
	NaOCl	Lạnh	30	-
	Acetone + NaOCl	Nhiệt độ phòng	15	1:10
Cua	Acetone	-	-	-
	3% H_2O_2	-	-	-
	Acidic H_2O_2	Nhiệt độ phòng	360	1:20
	3% H_2O_2	60	120	-
	0,32% NaOCl	Nhiệt độ phòng	3	1:10

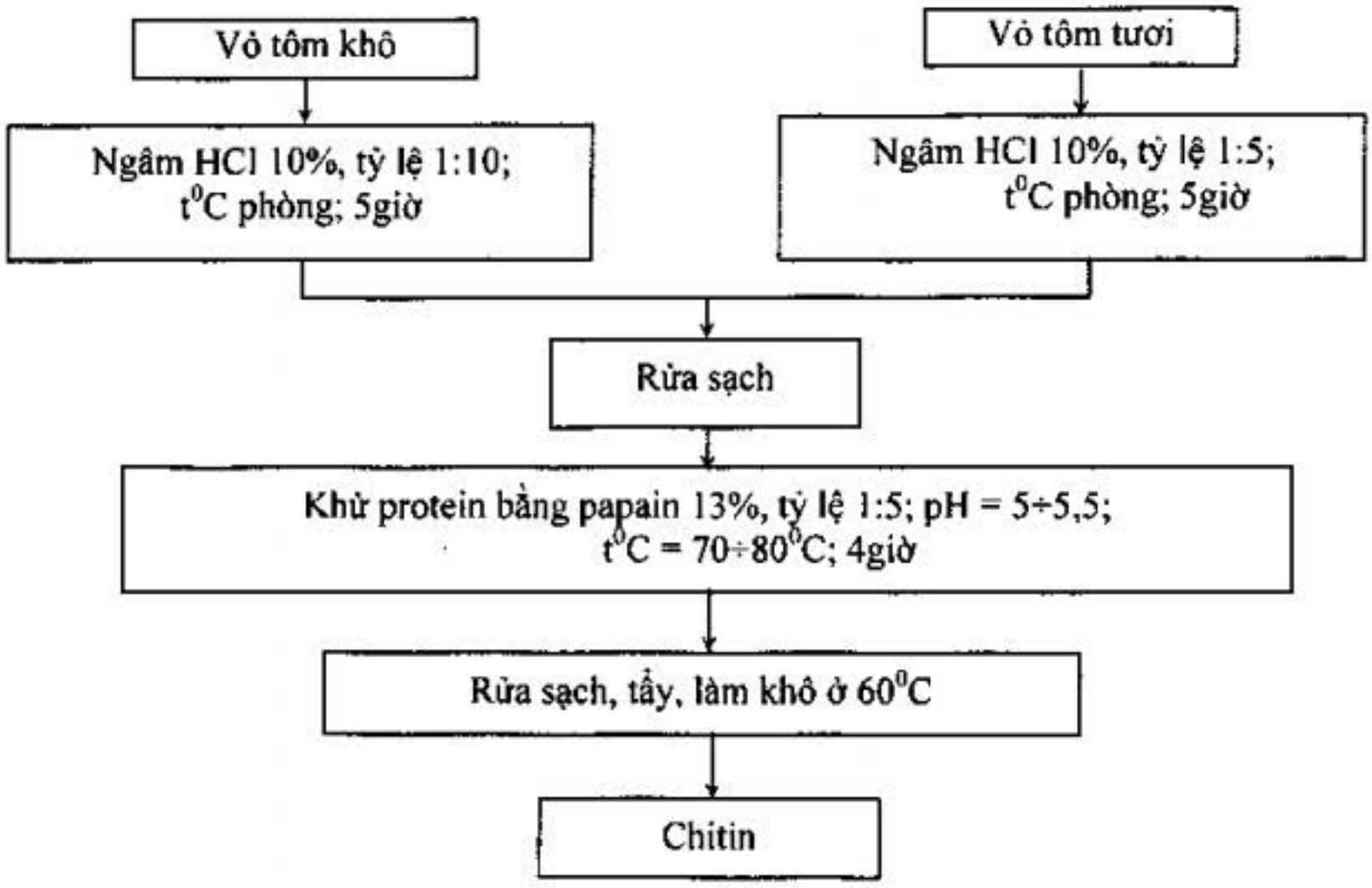
Chitin thu được từ nguyên liệu thuỷ sản tập trung ở 2 loại: α-chitin và β-chitin. Hàm lượng chitin có trong từng loại phế liệu biến đổi theo từng loại phế liệu. Chitin sản xuất từ phế liệu tôm là α-chitin và từ xương mực là β-chitin theo những điều kiện xử lí có sự khác nhau vì cấu trúc nguyên liệu và thành phần nguyên liệu khác nhau. Điều kiện của quá trình tách protein và khoáng đối với phế liệu thuỷ sản khác nhau đối với mỗi loại nguyên liệu và yêu cầu chất lượng của sản phẩm chitin. Ngoài ra, quá trình tách khoáng và protein có thể thực hiện nhiều lần nếu sử dụng HCl và NaOH ở nồng độ thấp để đạt được độ tinh sạch theo yêu cầu của sản phẩm chitin. Đa số nguyên liệu cần xử lí tách màu để đạt được sản phẩm chitin có màu trắng đẹp, ngoại trừ chitin từ phế liệu mực không cần bước tẩy màu (Bảng 7.7).

Sử dụng enzyme và vi sinh vật trong công nghệ sản xuất chitin: xu hướng mới, công nghệ thân thiện môi trường

Enzyme protease được nghiên cứu rất nhiều để khử protein của các loại phế liệu giáp xác trong quá trình sản xuất chitin. Từ những năm 60 của thế kỉ trước, một số nghiên cứu về ứng dụng enzyme protease để thuỷ phân protein trong phế liệu giáp xác đã được thực hiện bởi Takeda và Abe (1962), Takeda và Katsuura (1964). Những năm tiếp theo và gần đây, sử dụng enzyme càng được quan tâm, thể hiện qua các nghiên cứu của Shimahara và Takiguchi (1988) đã dùng enzyme protease vi sinh vật từ *Pseudomonas maltophilia* để khử protein trong vỏ tôm, cua. Enzyme proteinase từ cá ngừ tại pH 8,6 và 37,5°C, papain tại pH 5,5 – 6,0 và 37,5°C, hoặc proteinase vi sinh ở pH 7,0 và 60°C trên 60 giờ cũng đã được nghiên cứu thuỷ phân protein trong quá trình sản xuất chitin. Sau khi xử lí với enzyme, hàm lượng protein còn lại trong chitin khoảng 5%. Nellie Gagne và cộng sự (1993) đã dùng hai enzyme protease là chymotrypsin và papain để thuỷ phân protein trong phế liệu tôm đã được khử khoáng để thu hồi chitin. Các điều kiện tối ưu cho công đoạn khử protein bằng chymotrypsin là nhiệt độ trong khoảng 40°C, pH 8,0 và tỉ lệ enzyme với phế liệu tôm (E/W) là 7:1000 (w:w). Với papain, nhiệt độ là 38°C, pH 8,7 và E/W là 10:1000 (w:w). Lượng protein còn lại trong phế liệu tôm sau khi khử protein là khá thấp, cụ thể là 1,3 và 2,8% đối với các mẫu xử lí chymotripsin và papain. Synowiecki và cộng sự (2000) dùng enzyme alcalase để thuỷ phân protein từ phế liệu tôm *Crangon*, thu hồi được 64,3% protein. Sử dụng protease để thay thế cho NaOH khắc phục được các hạn chế của việc sử dụng hoá chất. Tại Việt Nam, một số nghiên cứu đã ứng dụng protease (papain, alcalase, protamex, flavourzyme) để khử protein trong quá trình sản xuất chitin.

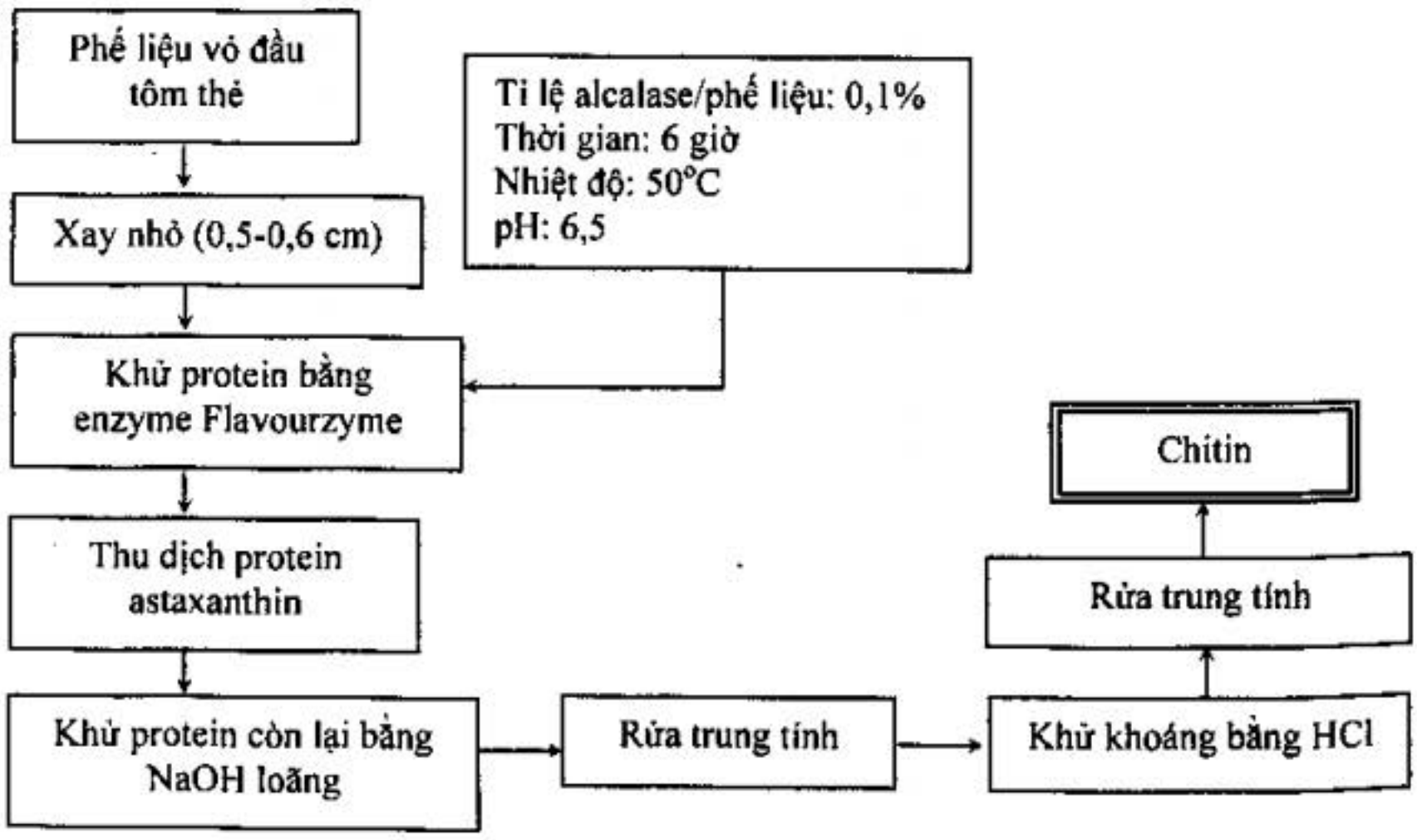
Dưới đây, một số quy trình sản xuất chitin sử dụng enzyme protease được trình bày:

Quy trình sản xuất chitin ứng dụng papain để khử protein (Trần Thị Luyến, 2000)



Trong quy trình này, quá trình khử protein được thực hiện bằng enzyme papain để thay thế xử lí bằng NaOH. Việc sử dụng papain cho phép hạn chế ô nhiễm môi trường, lượng papain dồi dào thu nhận từ thực vật. Ngoài ra, protein trong dịch thuỷ phân có thể sử dụng bổ sung vào thức ăn gia súc.

Quy trình sử dụng enzyme Flavourzyme trong công nghệ sản xuất chitin từ phế liệu tôm (Trang Sĩ Trung và cộng sự, 2007)



Các enzyme tripsin, pepsin và papain cũng được nghiên cứu để thuỷ phân carotenoprotein từ vỏ tôm *Metapenaeus monoceros* (Chakrabarti, 2002). Kết quả cho thấy, trypsin có hiệu suất thu hồi carotenoid cao nhất là 55% trong 4 giờ ở 28°C, pepsin và papain chỉ thu được 50%.

Tóm lại, có nhiều nghiên cứu và triển khai thử nghiệm sử dụng protease để thuỷ phân protein trong quá trình sản xuất chitin từ phế liệu thuỷ sản. Tuy nhiên, các kết quả nghiên cứu cho thấy sử dụng enzyme không khử triệt để được protein từ phế liệu thuỷ sản. Vì vậy, để triển khai ở quy mô sản xuất lớn cần nghiên cứu thêm để nâng cao hiệu quả quy trình có sử dụng enzyme.

Sử dụng acid hữu cơ để khử khoáng trong sản xuất chitin

Khử khoáng là một trong những công đoạn chính của quá trình sản xuất chitin từ phế liệu thuỷ sản. Thông thường quá trình khử khoáng được thực hiện bằng HCl. Tuy nhiên, quá trình xử lí bằng acid HCl có một số nhược điểm như cắt mạch của chitin, ăn mòn thiết bị và gây ô nhiễm môi trường. Vì vậy, một số nghiên cứu đã tiến hành thử nghiệm quá trình khử khoáng bằng lên men lactic hoặc sử dụng các acid hữu cơ như acid lactic, acid acetic thu nhận từ các quá trình sinh học. Charoenvuttiham và cộng sự (2006) đã sử dụng hỗn hợp acid hữu cơ (0,25M HCOOH và 0,25M acid citric $C_6H_8O_7$ theo tỉ lệ 1:2, v/v) là 1:28 (w/v) để tách khoáng đạt được độ tinh sạch của chitin thu được là 88,1 ± 1,8%. Mahmoud và Ghali (2006) đã dùng các acid hữu cơ (lactic acid và acetic acid) từ quá trình lên men nước ván sữa để khử khoáng của vỏ tôm, cua. Kết quả cho thấy hiệu quả của việc dùng lactic acid hoặc acid acetic để khử khoáng tương đối cao, tuy có thấp hơn acid citric khi khử khoáng bằng HCl. Điều kiện thích hợp để khử khoáng bằng acid hữu cơ: tỉ lệ nguyên liệu và acid là 1:20, nhiệt độ 24°C, thời gian 2 giờ. Với điều kiện trên, khoáng được khử khỏi vỏ tôm đạt 97,4% đối với acid lactic, 86,4% đối với acid acetic. Việc dùng các acid hữu cơ để khử khoáng là một phương pháp đầy hứa hẹn vì các lí do sau:

+ Các acid hữu cơ ít gây tác hại đối với môi trường.

+ Các acid hữu cơ có thể giữ được những đặc tính của chitin.

+ Các acid hữu cơ được sản xuất bằng các phương pháp sinh học sử dụng nguồn nguyên liệu có giá trị thấp hoặc phế liệu của các quá trình sản xuất công nghiệp.

+ Các muối hữu cơ thu được từ quá trình khử khoáng có thể được dùng như là chất bảo quản thực phẩm.

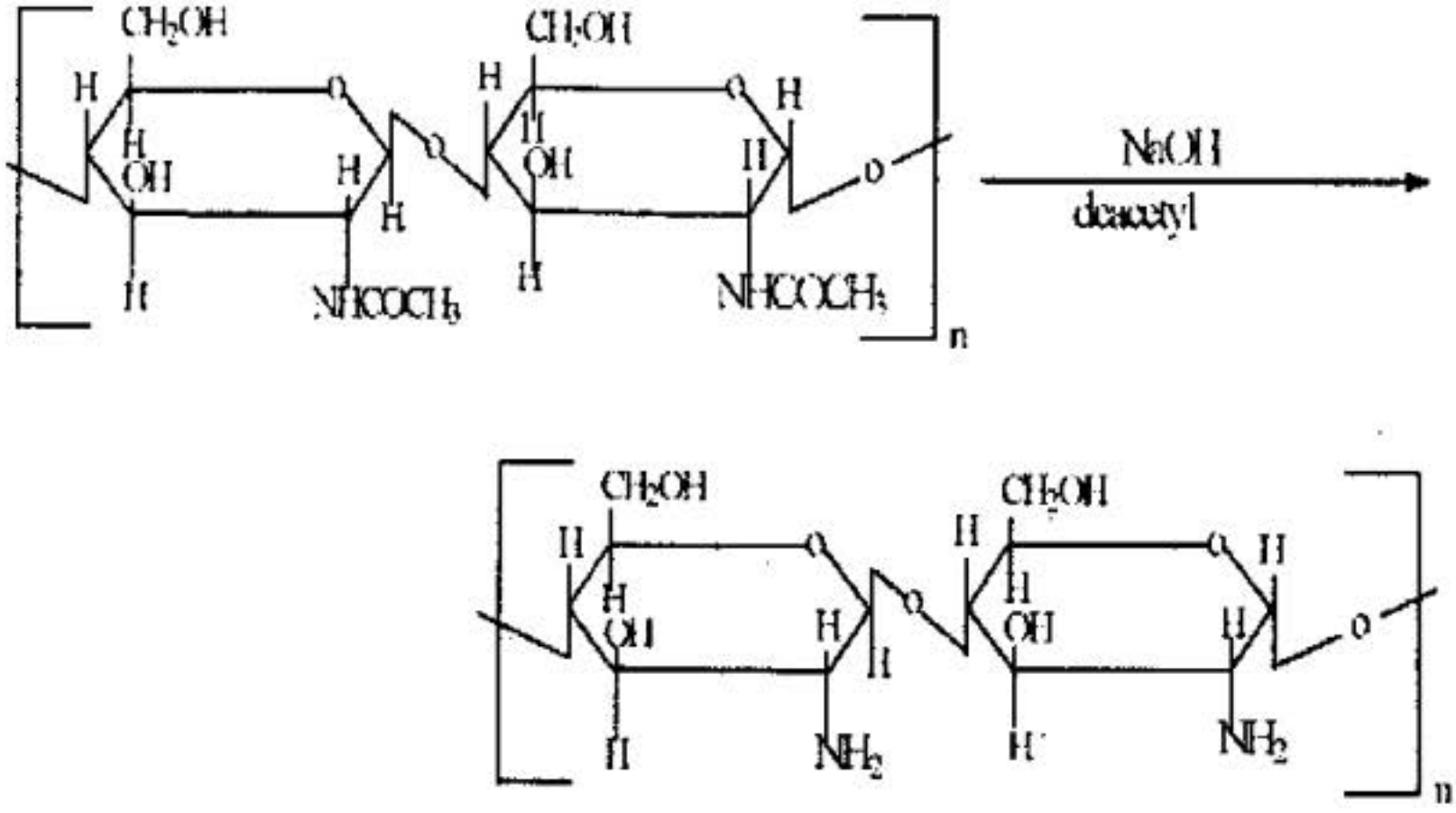
Khi sử dụng acid hữu cơ để tách khoáng thì chitin, chitosan thu được có độ tinh sạch cao, có thể đáp ứng về yêu cầu độ tinh sạch của chitin trong y dược, thực phẩm. Ngoài ra, chitin, chitosan thu được có phân tử lượng lớn và độ nhớt cao.

Sản xuất chitosan

Quá trình sản xuất chitosan từ chitin được thực hiện bởi công đoạn deacetyl (deacetylation), đây là quá trình tách nhóm acetyl khỏi phân tử chitin. Thông thường quá trình deacetyl được thực hiện bằng cách ngâm chitin trong dung dịch NaOH hoặc KOH đậm đặc. Nồng độ thường sử dụng từ 40 đến 50%, ở nhiệt độ 100°C hoặc cao hơn. Công đoạn deacetyl được thực hiện ở các chế độ rất đa dạng, phong phú, tuỳ thuộc vào nguồn chitin và yêu cầu về tính chất của chitosan .

Ngoài ra, người ta có thể sử dụng acid đặc để thực hiện quá trình deacetyl. Tuy nhiên, việc xử lí bằng acid đặc thường kèm theo quá trình cắt mạch của polymer, do đó thực hiện deacetyl trong môi trường kiềm đặc vẫn là phương pháp thường được sử dụng.

Quá trình deacetyl theo phản ứng sau:



Bảng 7.8 Các điều kiện deacetyl thường sử dụng đối với các nguồn chitin khác nhau

Nguồn gốc chitin	Điều kiện deacetyl				
	Nồng độ kiềm		Nhiệt độ (^{0}C)	Thời gian (h)	Tỉ lệ (w/w, v)
Tôm hùm	55%	KOH	100 – 140	0,5 – 1,5	1:100
Cua	47%	NaOH	60, 110	1,2x1 – 4	-
	40%	NaOH		10	-
Tôm sú	50%	NaOH	100	0,5 – 5	-
	50%	NaOH	145 – 150	1/12, 1/4	1:10
	50%	NaOH	60	2	1:4
	50%	NaOH	100	0,5x2	1:15
	50%	NaOH	100	0,75x2	1:15
	50%	NaOH	95	3	-
Tôm thẻ	50%	NaOH	30	24 – 144	1:14 – 56
	60%	KOH	100	1	1:65
	50%	NaOH	100	2	-

Hiệu quả của quá trình deacetyl phụ thuộc vào nhiều yếu tố. Dưới đây, các nhân tố ảnh hưởng chính được trình bày:

– Nhiệt độ của quá trình deacetyl: Nhiệt độ càng cao thì quá trình deacetyl diễn ra càng nhanh. Sản phẩm chitosan thu được có độ deacetyl cao. Tuy nhiên, nhiệt độ cao ảnh hưởng lớn đến phân tử lượng của chitosan.

– Thời gian và nồng độ kiềm: Quá trình deacetyl diễn ra nhanh ở giai đoạn đầu. Theo Wu và Bough (1978), quá trình deacetyl đạt được 68% trong thời gian 1 giờ khi thực hiện deacetyl với nồng độ 50% NaOH ở nhiệt độ 100^{0}C. Tuy nhiên, quá trình deacetyl diễn ra chậm lại, sau 5 giờ chitosan chỉ đạt được 78% DD. Kết quả của nghiên cứu này cũng cho thấy, sau 2 giờ xử lí độ deacetyl không thay đổi nhiều so với 1 giờ mà chỉ có phân tử lượng của chitosan xử lí sau 2 giờ giảm đáng kể, điều đó cho thấy, từ sau 1 giờ đến hết 2 giờ, chủ yếu diễn ra quá trình cắt mạch chitosan. Ngoài ra, nồng độ kiềm cũng ảnh hưởng đến chất lượng chitosan. Nếu nồng độ kiềm quá cao thì sẽ ảnh hưởng đến độ nhớt và phân tử lượng của chitosan. Tuy nhiên, nếu nồng độ kiềm xử lí nhẹ dẫn đến sản phẩm chitosan sẽ không tan hoặc tan không hoàn toàn.

– Tỉ lệ giữa chitin và dung dịch kiềm: Tỉ lệ chitin: dung dịch NaOH thường dùng là 1:10, trong một số nghiên cứu sử dụng tỉ lệ 1:15.

– Ảnh hưởng của chất lượng chitin ban đầu: nếu chitin ban đầu không được chiết rút trong điều kiện phù hợp (ví dụ: xử lí tách khoáng ở nồng độ acid HCl quá cao, thời gian dài) thì chitin bị cắt mạch dẫn đến chitosan thu được có phân tử lượng và độ nhớt thấp. Kích thước của chitin ban đầu, kích thước hạt càng nhỏ thì quá trình deacetyl hoá diễn ra nhanh và sản phẩm chitosan thu được có chất lượng cao hơn (độ nhớt, phân tử lượng, độ tan tốt hơn).

– Điều kiện môi trường xử lí: Để hạn chế sự cắt mạch chitin trong quá trình deacetyl hoá, người ta thực hiện công đoạn này trong môi trường khí nitơ để hạn chế sự tiếp xúc với oxy không khí. Kết quả nghiên cứu của Bough và cộng sự (1978) khẳng định deacetyl hoá trong môi trường khí nitơ thì tạo ra sản phẩm chitosan có phân tử lượng và độ nhớt cao hơn sản phẩm chitosan được deacetyl hoá trong môi trường không khí.

Quá trình deacetyl diễn ra chậm, đặc biệt ở nhiệt độ thấp, vì vậy muốn rút ngắn thời gian sản xuất thì công đoạn deacetyl nên thực hiện ở nhiệt độ cao. Độ deacetyl của sản phẩm chitosan thu được phụ thuộc nhiều vào các yếu tố nồng độ NaOH sử dụng, nhiệt độ và thời gian xử lí. Nồng độ NaOH và nhiệt độ xử lí càng cao thì độ deacetyl đạt càng cao. Tuy nhiên, phân tử lượng của sản phẩm chitosan thu được sẽ thấp.

Để đạt được độ deacetyl cao trên 90% thì một thì cần thực hiện quá trình deacetyl nhiều lần. Kết quả nghiên cứu của Trung và cộng sự (2006) cho thấy muốn chitosan thành phẩm đạt được độ deacetyl 96% khi sử dụng chitin từ phế liệu tôm thì cần phải thực hiện công đoạn deacetyl ở nhiệt độ 65°C và xử lí 2 lần (Bảng 7.9). Thực hiện quá trình deacetyl một lần khó đạt được độ deacetyl cao trên 90% vì giai đoạn cuối của quá trình deacetyl thì tốc độ tách nhóm acetyl diễn ra rất chậm. Tuy nhiên, sau khi rửa sạch mẫu và tiếp tục deacetyl thì quá trình deacetyl diễn ra nhanh hơn và đạt được độ deacetyl cao.

Bảng 7.9 Độ deacetyl hoá của chitosan ở các điều kiện xử lí khác nhau (Trung và cộng sự, 2006)

Nồng độ NaOH (%)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giờ)	Số lần xử lí lặp lại	Độ deacetyl (%)
50	40	24	1	75
50	65	20	1	87
50	65	20	2	96

Tuy nhiên, cần phải lưu ý là chế độ deacetyl ảnh hưởng lớn đến phân tử lượng và độ nhớt của chitosan của sản phẩm chitosan, chế độ deacetyl càng cao (nồng độ NaOH cao, nhiệt độ cao, thời gian dài) thì chitosan thu được có phân tử lượng thấp (Bảng 7.10). Do đó, để đạt được độ nhớt cao, phân tử lượng lớn thì thực hiện quá trình deacetyl ở chế độ phù hợp, không nên sử dụng nồng độ NaOH quá cao, nhiệt độ quá cao.

Bảng 7.10 Phân tử lượng của chitosan ở các điều kiện deacetyl hoá khác nhau (Methacanon và cộng sự, 2003)

Điều kiện xử lí	Phân tử lượng $*10^{-5}$ (dalton)
NaOH 40%, 80°C, 120 phút	8,74
NaOH 40%, 100°C, 60 phút	4,58
NaOH 60%, 80°C, 60 phút	10,9
NaOH 60%, 80°C, 120 phút	8,87
NaOH 60%, 100°C, 60 phút	4,53
NaOH 60%, 100°C, 120 phút	3,22

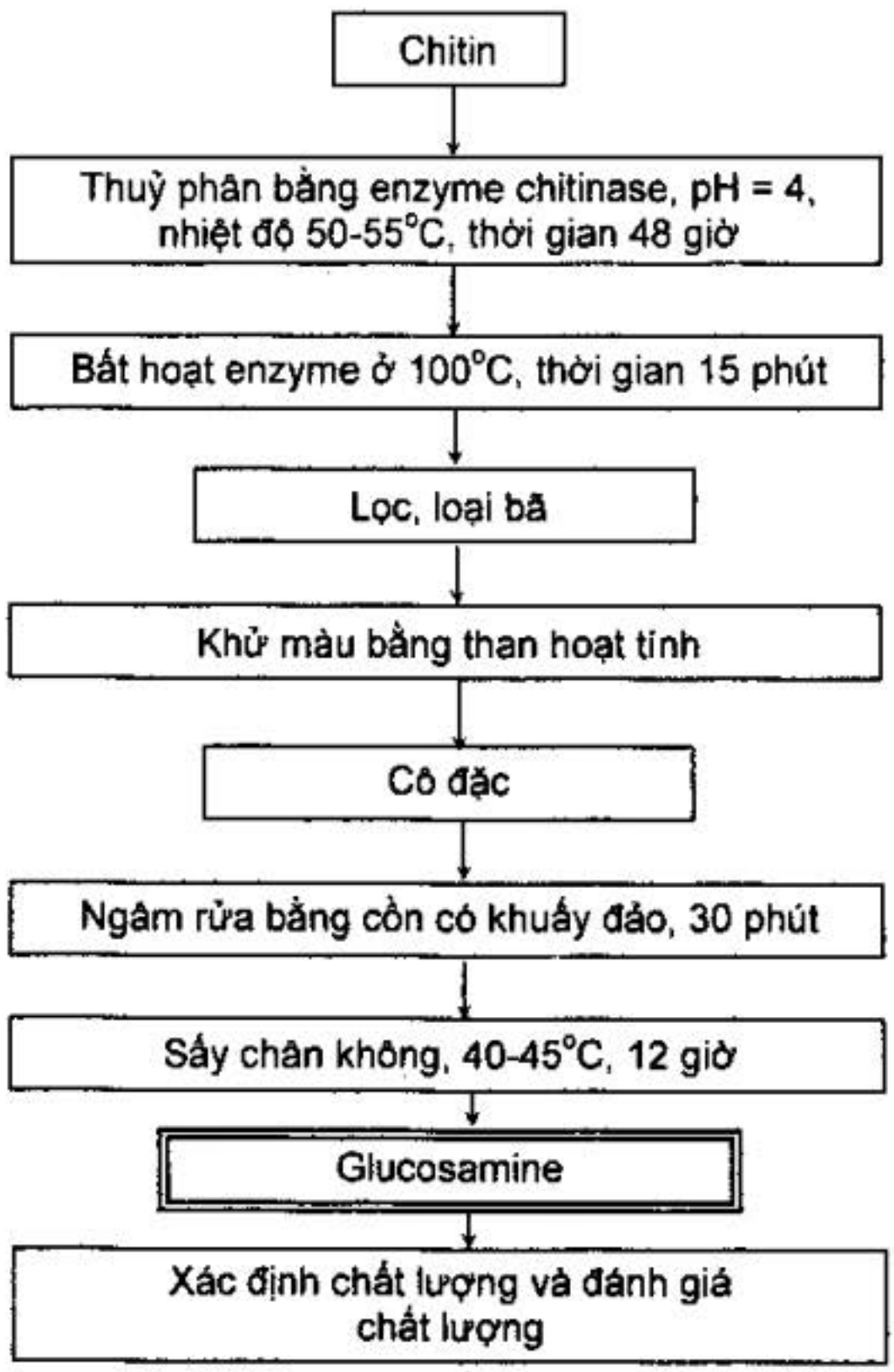
Deacetyl bằng phương pháp sinh học

Quá trình deacetyl bằng phương pháp sinh học được nghiên cứu khá nhiều nhưng chủ yếu thực hiện ở quy mô phòng thí nghiệm (Araki và Ito, 1974; Martinou và cộng sự, 1995; Tokuyasu và cộng sự, 1997; Martinou và cộng sự, 1998; Shrestha và cộng sự, 2004; Stevens. 2005). Chitin deacetylase (CDA) thu nhận từ nấm *Absidia coerulia* được sử dụng để thử nghiệm deacetyl chitin. Áp dụng enzyme để deacetyl chitin có nhiều ý nghĩa như nâng cao chất lượng sản phẩm chitosan (đặc biệt là độ nhớt và phân tử lượng), tránh sử dụng hoá chất đậm đặc (NaOH đặc), hạn chế ô nhiễm môi trường. Các kết quả cho thấy quá trình deacetyl bằng CDA chủ yếu thực hiện đối với chitin đã deacetyl một phần (partialli deacetylated chitin), còn đối với chitin tự nhiên thì còn quá trình deacetyl bằng CDA không hiệu quả. Hiệu quả deacetyl của CDA sẽ được tăng lên nếu chitin được xử lí giảm độ rắn trước khi deacetyl bằng CDA (Stevens, 2005).

Việc giảm độ rắn có thể kết hợp với việc giảm kích thước của hạt chitin để nâng cao hiệu quả quá trình deacetyl bằng enzyme. Quy trình sản xuất chitin tinh khiết có độ rắn thấp, kích thước nhỏ bằng phương pháp hoà tan trong methanol-$CaCl_2$ và kết tủa có hiệu quả cao, dễ thực hiện, chất lượng chitin thu được tốt, ứng dụng có hiệu quả trong việc deacetyl bằng CDA. Với loại chitin này, quá trình deacetyl hoá bằng enzyme CDA có thể thực hiện với độ DD từ 15 đến 85% (Stevens, 2005).

Sản xuất glucosamine bằng phương pháp sinh học

Glucosamine được sản xuất từ chitin của mực theo công nghệ mới sử dụng enzyme chitinase chiết rút từ vi sinh vật (Setthakaset và cộng sự, 2008). Phương pháp này có ưu điểm là không sử dụng hoá chất nên dịch thuỷ phân chitin không cần phải trung hoà, quá trình rửa nhanh, glucosamine thu được có chất lượng cao. Chitin từ xương mực với yêu cầu độ ẩm <6%, hàm lượng khoáng và protein <1%, ở dạng bột mịn. Tiếp theo tiến hành thuỷ phân bằng enzyme chitinase được thu nhận từ *Aspergillus sp*. Thuỷ phân trong điều kiện pH 4, nhiệt độ 50-55°C, thời gian 48 giờ. Tiếp theo bất hoạt enzyme ở nhiệt độ 100°C, thời gian 15 phút. Tiến hành lọc, loại bã và khử màu bằng than hoạt tính. Sau bước loại màu, dung dịch được cô đặc đến độ khô khoảng 20-25% và tiếp đến sản phẩm rửa bằng cồn, sấy ở nhiệt độ thấp thu được glucosamine thành phẩm. Phân tích đánh giá chất lượng trước khi đưa vào sản xuất sản phẩm chức năng.



Hình 7.9 Quy trình sản xuất glucosamine bằng phương pháp enzyme

4. Ứng dụng

a) Ứng dụng của chitin

Chitin có độc tính thấp và trơ trong hệ thống tiêu hoá của động vật có vú. Nó có thể bị phân huỷ sinh học do tồn tại các enzyme chitinase phân bố rộng rãi trong tự nhiên như vi khuẩn, nấm, thực vật, hệ tiêu hoá của nhiều loài động vật. Chitinase liên quan đến sự tự vệ của vật chủ chống lại sự xâm nhập của vi khuẩn. Lysozym từ lòng trắng trứng, cây đu đủ phân huỷ chitin và vách tế bào vi khuẩn.

Chitin được dùng để chuẩn bị cột sắc kí ái lực để cô lập các lectin và xác định cấu trúc của chúng. Chitin và 6-0-carboxymethyl-chitin hoạt hoá các đại thực bào ở màng bụng trong cơ thể sống, ngăn chặn sự phát triển của tế bào khối u ở chuột và kích thích sức chống đỡ không đặc hiệu đối với *E. coli*. Chitin còn làm cho quá trình liền vết thương diễn ra nhanh hơn.

Chitin được ứng dụng rộng rãi trong kĩ thuật cố định tế bào và enzyme trong công nghệ thực phẩm. Do tính chất phân huỷ sinh học, không độc, trơ về sinh lí, kháng khuẩn, ưa nước, tạo gel và ái lực với protein, chitin được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác như biosensor.

Vật liệu trên nền chitin dùng xử lí chất thải công nghiệp, hấp thụ các phức chất.

Chitin có thể chế tạo thành sợi hay màng mỏng và ứng dụng trong công nghiệp giấy. Tuy vậy ứng dụng mạnh nhất của chitin dạng sợi và màng mỏng là trong y dược như vật liệu băng vết thương và giải phóng chậm thuốc.

Oligomer chitin đã được xác nhận có tính chất chống ung thư và với DP=5 nó có hoạt tính trong việc điều khiển quá trình quang hợp của bắp và đậu nành.

b) Chitosan và dẫn xuất

Chitosan và dẫn xuất của chúng có rất nhiều ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như nông nghiệp, công nghiệp thực phẩm, công nghiệp nhẹ, y học và một số ngành khác (Hirano, 1996; Trung và cộng sự, 2005; Lee và cộng sự, 2009). Các ứng dụng chính được trình bày khá chi tiết trong sách Chitin-Chitosan từ phế liệu thuỷ sản và ứng dụng (Trung và các tác giả, 2010), ở đây chỉ trình bày ngắn gọn các ứng dụng chính hoặc ứng dụng mới của chitin và chitosan.

c) Ứng dụng trong thực phẩm và thức ăn gia súc

+ Chất kháng vi sinh: kháng khuẩn, kháng nấm.

+ Chất phụ gia: chất tạo độ cứng, chất tạo keo.

+ Chất kiểm soát dinh dưỡng vì có khả năng hấp thụ mỡ và cholesterol.

+ Chất cố định enzyme.

+ Chất xử lí màu.

+ Chất mang hoạt tính sinh học trong thức ăn gia súc.

+ Chất thu hồi protein và chất hấp thụ tannin.

d) Ứng dụng trong xử lí môi trường

+ Xử lí màu trong nước thải (đặc biệt là nước thải các nhà máy dệt nhuộm).

+ Xử lí kim loại trong nước thải.

+ Xử lí chất huyền phù trong nước thải, cô đặc nồng độ thải để giảm thể tích nước thải cần phải xử lí.

+ Màng lọc sinh học.

e) Ứng dụng trong công nghệ sinh học

+ Làm giá thể hoạt hoá cho công nghệ cố định tế bào và enzyme.

+ Làm chất mang cho công nghệ cố định DNA dùng trong y học.

+ Màng lọc sinh học.

+ Tổng hợp polymer sinh học.

f) Ứng dụng trong y học và mĩ phẩm

+ Da nhân tạo.

+ Màng làm đông máu.

+ Băng sinh học kháng khuẩn.

+ Chỉ tự tiêu trong y khoa.

+ Chất kích hoạt làm tăng quá trình lành vết thương.

+ Vật liệu sinh học trong công nghệ răng nhân tạo.

+ Chất mang và kiểm soát việc giải phóng thuốc.

g) Ứng dụng trong nông nghiệp

+ Bảo quản hạt giống.

+ Chất kích hoạt sinh học cho cây và vật nuôi.

+ Chất mang hoạt tính sinh học trong phân vi sinh.

+ Chất kháng nấm, kháng khuẩn.

+ Phân sinh học.

+ Chất hoạt tính sinh học bổ sung cho thức ăn gia súc.

h) Các ứng dụng khác

+ Chất làm tăng độ bắt màu, chất kháng vi sinh vật trong công nghệ dệt nhuộm, vải sợi, ứng dụng trong công nghệ làm vải côn, vải chịu nhiệt.

+ Chất kháng nấm trong công nghệ sơn.

+ Chất nền, chất mang trong công nghệ sắc kí.

+ Chất phụ gia trong công nghiệp giấy.

Chitosan có khả năng tạo màng rất tốt. Màng chitosan có tính kháng khuẩn, khả năng ngăn cản không khí cao nên nó được sử dụng trong lĩnh vực thực phẩm, màng bao kiểm soát quá trình giải phóng thuốc, màng lọc, màng để cố định tế bào, enzyme, màng bọc hạt giống. Tính chất cơ lí của màng chitosan như độ chịu kéo, độ rắn, độ ngấm nước, phụ thuộc nhiều vào phân tử lượng và độ deacetyl hoá của chitosan. Sức căng của màng chitosan phụ thuộc nhiều vào phân tử lượng của chitosan. Trong công nghệ thực phẩm, màng chitosan được dùng để bao bọc thực phẩm, giúp hạn chế khả năng mất nước cũng như chống lại phát triển của vi sinh vật trên thực phẩm trong quá trình bảo quản. Như vậy, việc dùng màng chitosan bao bọc thực phẩm có thể kéo dài thời gian bảo quản, giảm sự hư hỏng do vi sinh vật gây ra hay do sự mất nước. Chitosan cũng được ứng dụng làm chất kết dính, chất liên kết. Chitosan có thể gắn kết tốt với lipid, protein, các chất màu. Nhờ độ nhớt cao nên chitosan có tính kết dính cao, đồng thời do tính chất không tan trong nước nên khi được sử dụng làm chất kết dính thì nó thể hiện tính bền cao hơn trong môi trường nước so với các polymer tan trong nước như alginate, agar. Khả năng kết dính phụ thuộc nhiều vào phân tử lượng, độ deacetyl hoá, độ rắn và độ tinh khiết của chitosan. Chitosan được ứng dụng nhiều trong công nghệ xử lí nước thải vì có khả năng hấp phụ kim loại nặng, các chất hữu cơ, chất màu.

Trong ngành công nghệ sinh học, chitosan cũng có rất nhiều ứng dụng trong cố định enzyme, cố định tế bào, nuôi cấy mô, chất kích thích tố. Trong y học, chúng giúp đẩy nhanh quá trình làm lành vết thương hình thành mô da. Điều này rất quan trọng, đặc biệt đối với các bệnh nhân bị tiểu đường. Chitin và các dẫn xuất có thể được áp dụng một cách an toàn với động vật, cũng như con người. Các hình thức khác nhau của các sản phẩm chitin dùng cho các ứng dụng y tế ở dạng bột, màng, keo.

Chitin và dẫn xuất của chúng làm tăng quá trình sinh ra các protein bảo vệ chẳng hạn như lyzozym. Việc ứng dụng chitosan làm chất kiểm soát quá trình giải phóng thuốc và các chất có hoạt tính sinh học (Insulin, Vitamin, ADN). Ngoài ra, chitosan được sử dụng trong việc giảm béo vì chitosan gắn kết với chất béo trong dạ dày trước khi nó được tiêu hoá, do đó bẫy chất béo và ngăn ngừa sự hấp thụ của nó bằng đường tiêu hoá. Chất béo liên kết với các chất xơ chitosan, tạo thành một khối mà cơ thể không thể hấp thụ, và được loại bỏ bởi cơ thể. Chitosan tích điện dương nên có khả năng tương tác hoá học với các chất béo tích điện âm và các acid của mật (Lee và cộng sự, 2009).

CHƯƠNG 8

COLLAGEN – GELATIN

1. Sơ lược lịch sử, thuật ngữ

Collagen là loại protein có nhiều nhất trong động vật có xương sống và chiếm tới 30% protein của cơ thể. Cấu trúc collagen đã được nghiên cứu trong nhiều thập niên và được xác nhận tính chất đều đặn trong cấu trúc vào thập niên 1930. Từ đó có nhiều nghiên cứu được tiến hành bao gồm các nhà hoá học lỗi lạc được giải Nobel như Pauling, Crick. Collagen tạo bởi 3 chuỗi polypeptide xoắn với nhau thành dạng hình gậy (rod). Có ít nhất 28 loại collagen, đánh số từ I-XXVIII. Collagen loại I phổ biến nhất trong các mô liên kết, bao gồm gân, xương và da. Nó cũng có trong giác mạc, mạch máu, dây chằng, ruột, đĩa sụn xương sống. Các nguyên bào sợi (fibroblast) là các tế bào phổ biến tạo nên collagen. Collagen đã được biết đến từ xa xưa trong công nghệ thuộc da. Từ đó đến nay, collagen đã có nhiều ứng dụng từ công nghiệp, thực phẩm cho đến mĩ phẩm và y dược.

2. Cấu trúc hoá học

Các tropocollagen hay phân tử collagen là một thành phần của sợi collagen kết hợp. Nó có chiều dài khoảng 300 nm, đường kính 1,5 nm, tạo bởi 3 chuỗi polypeptide có cấu trúc xoắn trái, gọi là sợi ba, hay super helix. Đó là một cấu trúc bậc bốn tạo nên bởi các liên kết hydro.

Collagen được tạo thành từ ba sợi polypeptide xoắn lại với nhau trong đó thường có hai sợi giống nhau (α1) và một sợi thứ ba có thành phần hoá học khác một ít (α2). Các acid amin trong mạch collagen có trình tự glycine-proline-X và glycine-X-hydroproline, với X làm một acid amin khác glycine, proline và hydroproline.

Thành phần hoá học của collagen từ da động vật có vú và da cá có tính tương đồng tuy có khác nhau đôi chút. Riêng da cá sống ở vùng nước lạnh và vùng nước ấm cũng khác nhau.

Proline hay hydroproline chiếm 1/6 toàn bộ chuỗi trong khi glycine chiếm khoảng 1/3. Điều đó có nghĩa là ba loại acid amin này chiếm một nửa lượng acid amin của toàn bộ chuỗi, còn một nửa là các acid amin khác. Hàm lượng glycine cao là rất quan trọng cho việc ổn định sợi xoắn vì nó cho phép các sợi kết hợp với nhau gần hơn, tạo điều kiện cho các liên kết hydro dễ dàng hơn và tạo nên các liên kết giữa các phân tử. Sự lập lại đều đặn của glycine là rất ít gặp trong các protein khác cho thấy tính đặc thù của collagen. Khi quan sát sợi collagen trên kính hiển vi điện tử, ta thấy các vân đều đặn dọc trục có khoảng cách 67nm. Các nhóm bên của acid amin không cần thiết

cho việc tạo nên cấu trúc của protein, tuy nhiên collagen không đơn thuần là một protein cấu trúc. Do vai trò chính của nó trong việc xác định kiểu hình của tế bào, tính dính sinh học của tế bào, điều hoà mô và khung cơ bản của mô, nhiều phần của mạch không chứa proline có vai trò điều hoà hoặc kết hợp tế bào. Vùng có nhiều proline và hydroproline, với các nhóm carboxyl và amin, cùng với việc giàu glycine, có xu hướng làm cho sợi polypeptide tự xoắn trái mà không cần các liên kết hydro nội mạch.

Vì glycine là acid amin nhỏ nhất không có nhóm bên, nó đóng vai trò duy nhất trong sợi protein cấu trúc. Trong phân tử collagen, cứ mỗi ba acid amin lại có một glycine vì rằng để tạo nên chuỗi xoắn ba quanh một trục. sẽ không có chỗ cho bất kì nhóm bên nào lớn hơn nguyên tử hydro của glycine. Vì vậy các vòng của proline và hydroproline phải quay ra ngoài. Hai acid amin này giúp tạo nên sự ổn định của vòng. Chúng có hàm lượng trong cá ít hơn trong động vật máu nóng. Cá nước lạnh có ít hai acid amin này so với cá nước nóng. Nhưng cá nước nóng có tỉ lệ tương tự như động vật máu nóng. Hai acid amin này càng ít, tính ổn định nhiệt của collagen càng thấp. Do đó gelatin từ cá nước lạnh có nhiệt độ biến tính thấp và khó sử dụng.

Trong số 28 loại collagen, có 5 loại phổ biến nhất ở bảng sau:

Bảng 8.1 Thành phần của chuỗi và phân bố trên cơ thể của các loại collagen

Loại collagen	Thành phần chuỗi	Phân bố trên mô
I	$(\alpha1(I))_2\alpha2(I)$, trimer$(\alpha1(I))_3$	da, gân, xương, giác mạc, men răng, sụn sợi, mạch máu, ruột, tử cung, da trong
II	$(\alpha1(II))_3$	sụn trong suốt, dịch thuỷ tinh, trung phôi bì
III	$(\alpha1(III))_3$	mạch máu lớn, vách tử cung, van tim, nướu răng
IV	$((\alpha1(IV))_2\alpha2(IV)$	các màng cơ bản
V	$\alpha1(V)\alpha2(V)\alpha3(V)$ $(\alpha1(V))_2\alpha2(V)$ $(\alpha1(V))_3$	giác mạc, nhau thai, xương, mạch lớn, sụn trong suốt, nướu

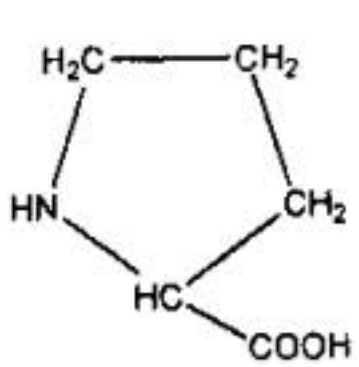
Ngoài cách phân loại trên, collagen còn được phân thành các nhóm con (subfamily), trong đó nhóm con collagen sợi (Fibrillar collagens), bao gồm các loại I, II, III, V, XI, XXIV và XXVII được đề cập nhiều nhất. Cũng như các collagen khác, các collagen sợi cấu tạo từ ba sợi polypeptide gọi là các sợi α. Các sợi đó có thể giống nhau như trong collagen loại II và loại III hay có thể là ba sợi khác nhau. Danh pháp của các sợi polypeptide là αn(N), trong đó N là số La Mã để chỉ loại collagen, n là số của sợi polypeptide. Do đó collagen loại II gồm 3 sợi polypeptide giống nhau có kí hiệu là $[\alpha1(II)]_3$, còn collagen loại I gồm có hai sợi polypeptide giống nhau α1 và một sợi khác là α2, kí hiệu là $[\alpha1(I)]_2\alpha2(I)$. Collagen loại V có ba sợi khác nhau tạo thành các dạng $[\alpha1(V)]_2\alpha2(V)$ và α1(V)α2(V)α3(V).

Đặc điểm chung của collagen sợi là có một vùng xoắn ba trung tâm khá dài trên mỗi sợi α, tạo thành từ một chuỗi lặp lại $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$ với n=337-343 tuỳ thuộc vào loại collagen. Ở các collagen I, II và III, các vùng này bị chen ngang bởi các vùng ngắn không có cấu trúc xoắn gọi là các telopeptide, thường có độ dài khoảng 20 gốc.

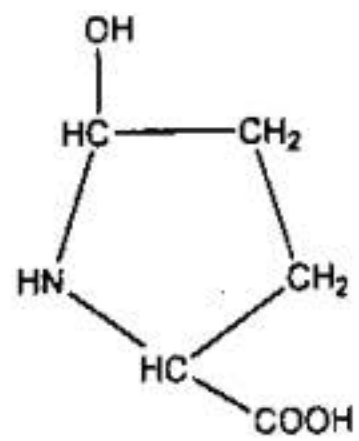
Do collagen loại I phổ biến nhất và có ứng dụng nhiều, sau đây cấu trúc của nó sẽ được xem xét chi tiết.

Cấu trúc bậc I (trình tự acid amin).

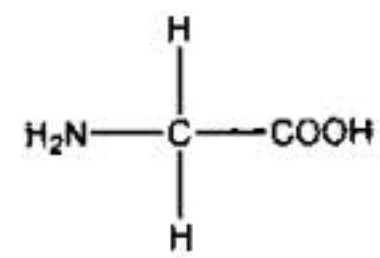
Collagen loại I gồm có 2 sợi α1(I) và một sợi α1(II). Thành phần acid amin trong các sợi collagen giữa các loài động vật chỉ khác nhau đôi chút. Trình tự acid amin trong chuỗi collagen theo thứ tự Gly-X-Y, trong đó 35% vị trí của X, Y là proline, hầu hết ở vị trí X và 4-hydroxyproline ở vị trí Y. Hydroxyproline chiếm khoảng 10% thành phần acid amin trong collagen. Collagen còn chứa một acid amin không thông dụng là hydroxylysine. Nó tạo cơ sở cho việc nối gốc đường vào collagen, một yêu cầu không thể thiếu để tạo vòng xoắn ba. Collagen loại I là một glycoprotein với carbohydrate chiếm ít hơn 1%. Thành phần đường là một galatose hay disaccharide của galactose và glucose *O*-glycosideicalli nối với gốc hydroxylysine. Các acid imin (proline+hydroxyproline) do có bản chất là vòng no làm cho vòng xoắn ba cứng hơn và các liên kết hydro làm hạn chế sự quay.



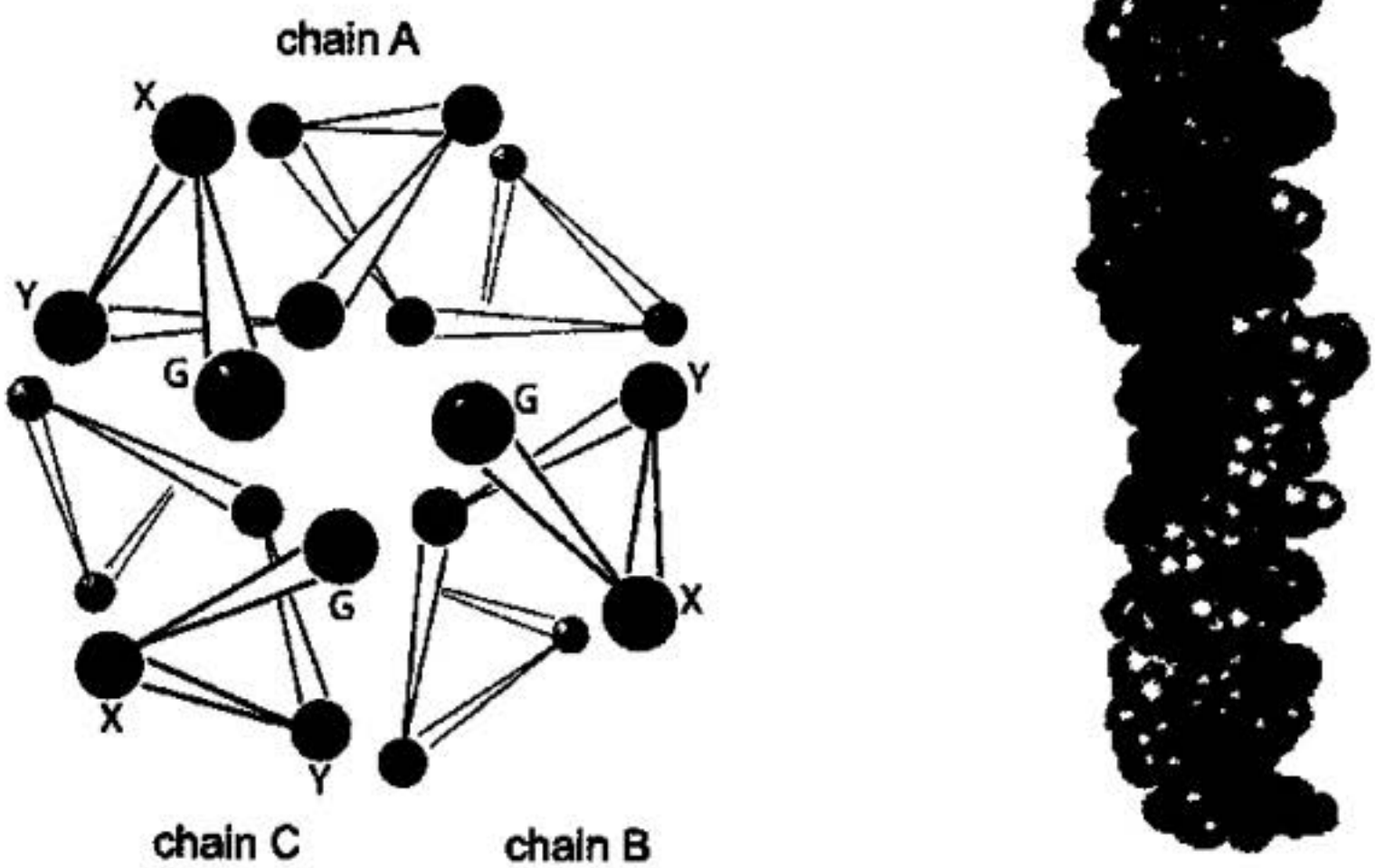
Proline



Hydroxyproline



Glycine

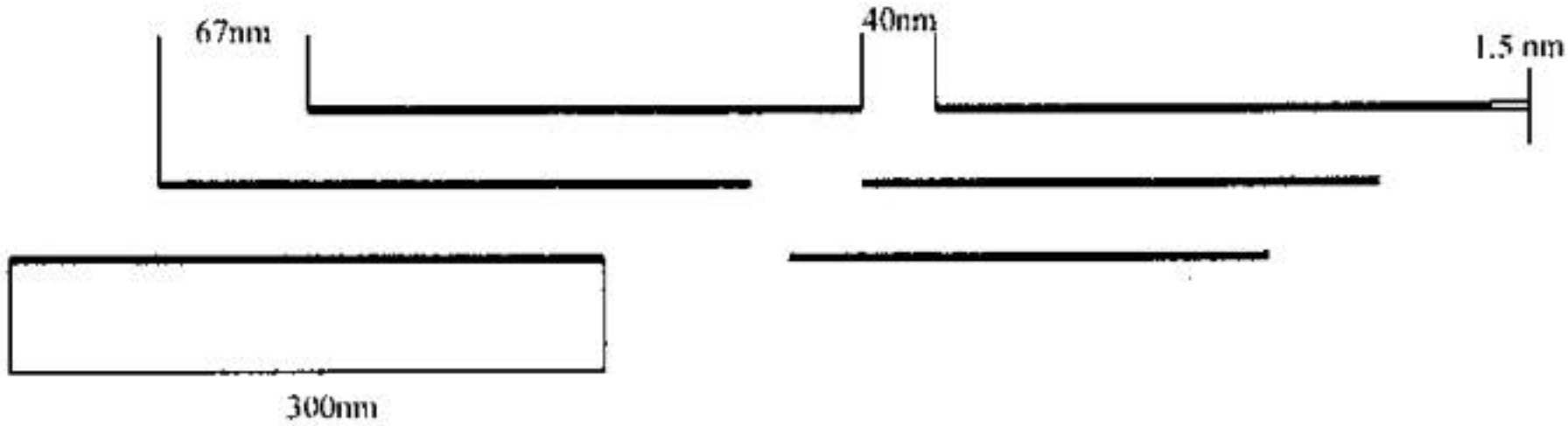


Hình 8.1 Các acid amin chính và cấu trúc collagen (Fratzl, 2008)

Cấu trúc bậc cao hơn

Sợi polypeptide có cấu trúc xoắn trái α với mỗi vòng xoắn tương ứng không phải là một số nguyên của acid amin mà là 3,3 acid amin với chiều dài một bước xoắn là 0,87nm và được xác nhận bằng phổ nhiễu xạ tia X (B. Brodsky, 1988). Cấu trúc bậc ba tạo nên một đơn vị cơ bản gọi là tropocollagen: ba sợi polypeptide liên kết với nhau theo kiểu xoắn phải với một bước xoắn dài 8,6 nm. Một thanh xoắn ba như vậy có khối lượng phân tử xấp xỉ 300 kDa, dài 300 nm với đường kính 1,5 nm (M.E. Nimi, 1988). Thêm vào đó, có một đoạn từ 9-26 acid amin ở các đầu cuối mang nhóm amin và đầu cuối mang nhón carboxyl không tham gia liên kết vào cấu trúc xoắn. Những vùng này gọi là telopeptide.

Để tạo cấu trúc bậc bốn, các phân tử xoắn ba xếp xen kẽ theo chiều dài và theo hai phía để tạo thành sợi với chu kì phân biệt. Các phân tử xếp xen kẽ với khoảng cách 67 nm và hai sợi tiếp nhau cách nhau 40 nm như hình vẽ.



Hình 8.2 Cấu trúc bậc 4 của collagen

3. Tính chất

a) Sự phân giải

Collagen có tính bền dưới các tác động của protease trung tính. Ở pH trung tính, chỉ có collagenase đặc hiệu mới có thể phân cắt collagen tại một vị trí ở ba phần tư khoảng cách tính từ đầu cuối N. Đó là các enzyme metalloproteinase có khối lượng phân tử khoảng 40-50 kDa. Sau khi vòng xoắn ba bị bẻ gãy, sự phân cắt collagen xảy ra sâu xa hơn do các enzyme gelatinase và proteinase không đặc hiệu tạo thành các peptide ngắn và các acid amin.

b) Tính kháng nguyên và sinh miễn dịch

Collagen được biết là một chất tương thích sinh học rất tốt do độc tính thấp và phản ứng sinh miễn dịch kém. Để giải thích cho tính chất đó người ta cho rằng do sự tương đồng của trình tự acid amin giữa các loài và hàm lượng thấp của các acid amin vòng thơm. Cần phân biệt hai khái niệm là tính sinh miễn dịch - immunogenicity và tính kháng nguyên - antigenicity. Tính sinh miễn dịch kéo theo một đáp ứng kháng thể còn tính kháng nguyên là sự tồn tại của các kháng thể. Động vật và con người có thể sản sinh ra các kháng thể đối với các ba loại kháng nguyên (antigenic determinant) trong phân tử collagen: một là phần cuối của các chuỗi collagen không xoắn vào nhau (gọi là P-determinant), hai là vùng trung tâm thể hiện ở trình tự acid amin, ba là cấu trúc xoắn bậc ba của collagen. Tầm quan trọng của mỗi determinant là do bản chất collagen và do quá trình chế biến. Ví dụ khi lấy chọn lọc phần cuối không xoắn của collagen, tính kháng nguyên bị hạn chế. Nhìn chung có khoảng 3% bệnh nhân có mức kháng thể chống cấy ghép (anti-implant) cao do cả hai loại kháng nguyên là cấu hình xoắn và trình tự acid amin sau khi tiêm và ghép. Mặc dầu có những vấn đề về lí thuyết, collagen động vật vẫn được dùng làm chỉ khâu, tác nhân cầm máu và collagen tiêm được cho là an toàn.

Collagen có cấu trúc dạng sợi, dài có chức năng rất khác các protein hình cầu như enzyme. Các bó collagen là thành phần chính của mạng lưới ngoại bào tạo độ chắc cho các mô và tạo hình dạng bên ngoài cho tế bào, nhưng collagen cũng được tìm thấy bên trong tế bào. Collagen có độ bền kéo tốt nên nó là thành phần chính của mô liên kết, sụn, dây chằng, gân, xương và da. Cùng với keratin, nó tạo độ bền và đàn hồi cho da. Khi collagen bị thoái hoá, nó tạo các nếp nhăn cùng với sự lão hoá da. Collagen làm chắc thành mạch máu và tham gia phát triển các mô. Collagen tồn tại trong giác mạc và thuỷ tinh thể của mắt ở dạng tinh thể.

Collagen do cấu trúc xoắn kép với nhiều liên kết giữa ba sợi polypeptide nên không tan trong nước. Trong khi đó, gelatin và collagen thuỷ phân có thể tan trong nước.

Trong các loại collagen, gelatin và collagen thuỷ phân thì điểm đẳng điện của collagen cao hơn của hai cái sau.

Gelatin hiện nay được xem là thực phẩm và không có mã số E. Gelatin tạo gel thuận nghịch khi chuyển sol-gel với nhiệt hoàn toàn và nó tan chảy trong miệng nên rất được ưa chuộng.

c) Động học tạo gel của gelatin

Các tính chất thuỷ lực của dung dịch gelatin phụ thuộc vào khối lượng phân tử và phân bố khối lượng phân tử. Tính nhớt và khả năng tạo gel được quan sát ở nhiệt độ khác nhau. Khi hạ nhiệt độ, các phân tử gelatin kết hợp với nhau thành từng cụm nhỏ (cluster) và xoắn lại với nhau theo từng đoạn, các cụm này lớn dần lên trùm lên toàn bộ thể tích và tạo thành khối gel.

Hai tính chất tạo gel và tạo độ nhớt không quan hệ tuyến tính với nhau. Do đó độ Bloom và độ nhớt không có quan hệ với nhau vì mỗi loại do các phân đoạn có khối lượng phân tử khác nhau quyết định. Độ bền gel (Bloom) phụ thuộc vào tỉ lệ của các phân đoạn có khối lượng phân tử khoảng 100 000 g/mol trong khi độ nhớt chịu ảnh hưởng của các phân đoạn từ 200 000 đến 400 000 g/mol. Do đó tuỳ thuộc vào phương pháp tách chiết, các loại gelatin với cùng độ Bloom có thể có độ nhớt khác nhau.

Ở nhiệt độ cao và nồng độ loãng, dung dịch gelatin có tính chất của dung dịch Newton, nhưng khi hạ nhiệt độ, bắt đầu có sự tương tác giữa các phân tử gelatin và tính chất dung dịch bắt đầu thay đổi. Khi nhiệt độ hạ thấp và tạo gel, khi đó khối gel có tính chất visco-elastic.

Có hai loại gelatin, loại A (acid) và loại B (base) tuỳ theo quá trình sơ chế của công nghệ sản xuất gelatin.

Độ bền gel của gelatin đo bằng độ Bloom. Để đo độ Bloom, người ta chuẩn bị gel có nồng độ gelatin 6,67% và để ở 10^0C trong 17 giờ trước khi đo. Độ Bloom là trọng lượng tính bằng gram cần thiết để một đầu ép chuẩn ép bề mặt khối gel xuống độ sâu 4 mm. Gelatin có độ bền gel thấp nếu độ Bloom<100, loại trung bình từ 100-200, loại cao từ 200-300.

4. Tách chiết

Collagen – gelatin được tách chiết từ da bò, da lợn, da cá là chủ yếu, tuy vậy, nó còn được chiết từ xương, gân, vảy cá... Mỗi loại nguyên liệu khác nhau đòi hỏi công nghệ tách chiết khác nhau.

Nhìn chung tách chiết collagen theo các bước chính là làm sạch nguyên liệu, khử protein không phải collagen, sau đó chiết collagen trong acid hoặc pepsin. Dịch thu được đem lọc, cô đặc và sấy khô. Để tránh collagen thuỷ phân, quá trình được tiến hành ở nhiệt độ thấp.

Đối với gelatin, quá trình chiết được tiến hành ở nhiệt độ cao hơn và khi đó các phân tử collagen sẽ bị thuỷ phân, bung các sợi xoắn kép ra một phần hay toàn bộ.

Một sản phẩm nữa là gelatin được thuỷ phân sâu xa hơn để tạo thành các đoạn polypeptide hoặc peptide mà tên gọi của nó là gelatin thuỷ phân hoặc collagen thuỷ phân. Các sản phẩm collagen thuỷ phân được sản xuất ở khối lượng phân tử trung bình là 1000 đến 5000 Da và dùng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm vì nó tan dễ dàng trong nước.

Trong các nguồn nguyên liệu sản xuất collagen, da cá trở nên được ưa chuộng. Collagen và gelatin từ da cá được xem là các protein độc đáo so với các protein từ cơ thịt cá và điều này tính độc đáo của cá nằm trong thành phần acid amin và chứa nhiều axit amin không phân cực (trên 80%) như Gly, Ala, Val và Pro (Kim và Mendis, 2006).

Sau đây một số phương pháp tách chiết collagen và gelatin được xem xét.

Collagen từ da cá

Do sự bùng phát bệnh bò điên (bovine spongiform encephalopathy, BSE), và bệnh lở mồm long móng (foot-and-mouth disease, FMD), việc sử dụng collagen và dẫn xuất của nó từ các phế liệu của động vật trên cạn gặp nhiều nghi ngại. Thêm vào đó, collagen sản xuất từ bò bị cấm sử dụng ở những cộng đồng người Sikh và người Hindu, trong khi collagen từ heo không thể sử dụng ở cộng đồng người theo đạo Hồi và người Do Thái. Do đó việc sử dụng collagen từ cá và nhuyễn thể được chú ý nhiều hơn.

Trong số các loài cá được chế biến, cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus)* có sản lượng ngày càng lớn và trở thành một nguồn nguyên liệu quan trọng

cho chế biến collagen/gelatin. Cá được nuôi ở nhiều nước như Việt Nam, Thái Lan, Indonesia, Malasia và Trung Quốc. Loài cá nước ngọt này sống ở vùng nhiệt đới, nước có pH từ 6,5 đến 7 và nhiệt độ từ 22-26^{0}C. Cá trưởng thành có thể dài đến 130 cm và nặng trên 40 kg. Cá tra được ưa chuộng trên thế giới. Công nghiệp chế biến phát triển sinh ra một lượng khổng lồ da cá, một nguồn chế biến collagen quan trọng. Tại Việt Nam, sản lượng cá tra khoảng 1,2 triệu tấn/năm. Với tỉ lệ da cá khoảng 5% trọng lượng cá, số lượng da sinh ra là 60 000 tấn. Nếu tính trung bình lượng collagen khoảng 10% trọng lượng da, sản lượng collagen khoảng 6000 tấn năm. Đây là một con số rất có ý nghĩa.

Để tách chiết collagen từ da cá, cần tách theo hai bước, đầu tiên tách chiết collagen tan trong acid, sau đó phần không tan được tách chiết trong pepsin. Quá trình chiết trong phòng thí nghiệm như sau:

Sơ chế da cá:

Mục đích công đoạn này là để loại bỏ các loại protein không phải là collagen. Da cá được trộn với NaOH 0,1M với tỉ lệ da:dung dịch là 1:10 (w/v). Hỗn hợp được khuấy trong 6 giờ ở 4^{0}C và dung dịch kiềm được thay 2 giờ một lần. Da sau đó được rửa sạch bằng nước đến trung tính.

Tách chiết phần collagen tan trong acid (Acid soluble collagen, ASC), theo Nagai and Suzuki (2000):

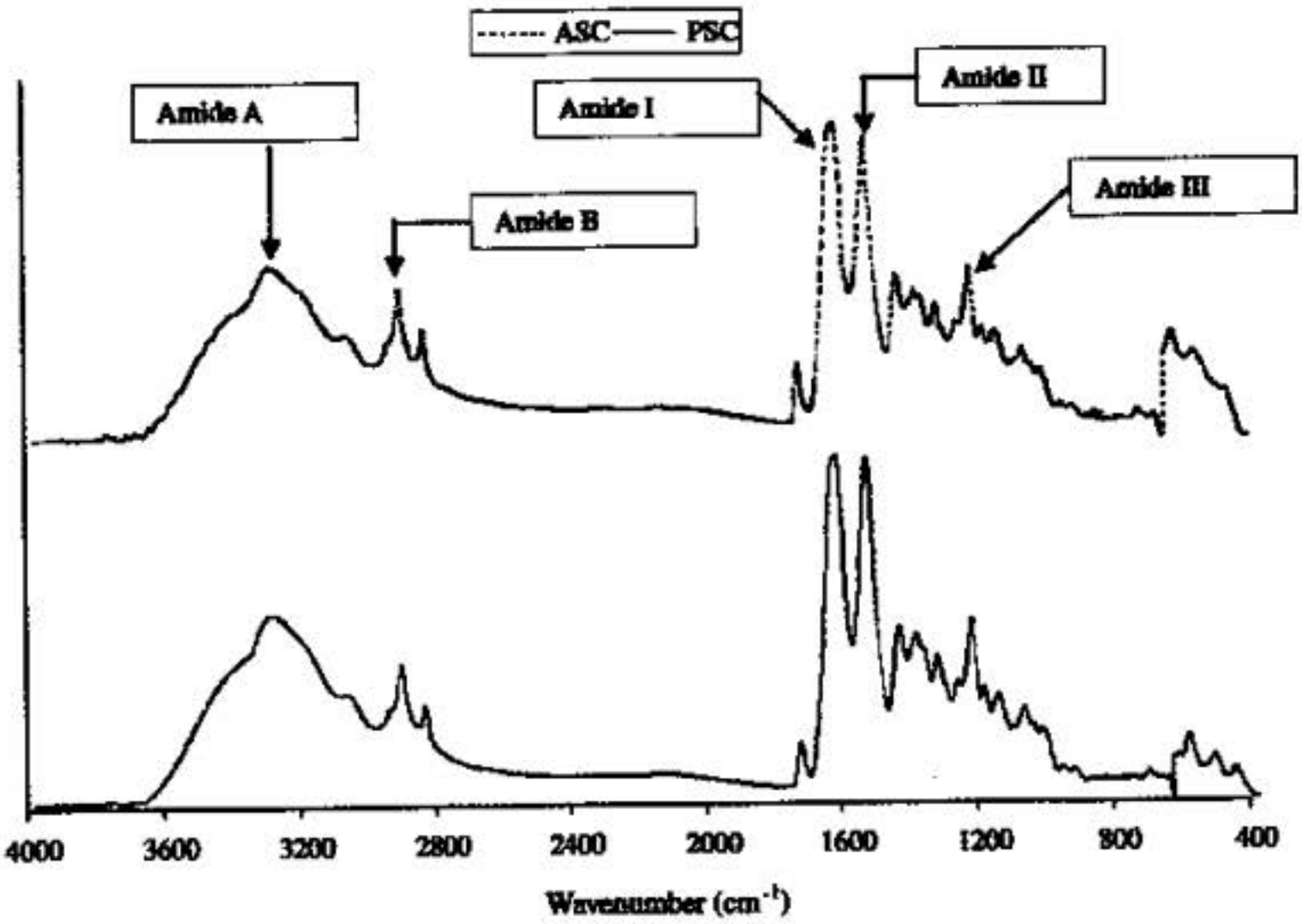
Tất cả các quá trình được tiến hành ở 4^{0}C. Da sau khi sơ chế được khử mỡ bằng butyl alcohol 10% với tỉ lệ da/dung môi là 1:10 (w/v) trong 48 giờ và thay dung môi sau mỗi 8 giờ.

Da sau khi khử mỡ được rửa trong nước lạnh (5-8^{0}C), sau đó ngâm trong acid acetic 0,5M với tỉ lệ da/dung môi là 1:15 trong 24 giờ. Dịch chiết được lọc và phần rắn được chiết lại như trên. Sau đó trộn hai dịch chiết lại. Collagen trong dịch chiết được kết tủa bằng cách thêm NaCl đến nồng độ trong dung dịch 2,6M với sự có mặt của 0,05M tris(hydroxymethyl) aminomethane, pH=7. Kết tủa được thu bằng li tâm 20 000g trong 60 phút. Phần rắn thu được được hoà tan trong thể tích tối thiểu của acid acetic 0,5M trong 24 giờ. Sau đó thẩm tích trong cùng thể tích nước trong 24 giờ nữa. Chất thẩm tích là collagen tan trong acid, ASC.

Tách chiết collagen tan trong pepsin (pepsin soluble collagen, PSC)

Phần bã không tan trong acid ở công đoạn trên được dùng để chiết tiếp collagen tan trong pepsin. Ngâm bã trong acid acetic 0,5M với tỉ lệ chất

rắn/dung dịch là 1:15 và thêm pepsin từ heo vào (20U/g bã). Hỗn hợp được khuấy liên tục trong 48 giờ, sau đó lọc để lấy dịch trong. Dịch lọc cũng được kết tủa và thẩm tích như trên. Chất thẩm tích được đông khô và gọi là collagen tan trong pepsin, PSC.



Hình 8.3 Phổ IR của hai loại collagen tan trong acid và tan trong pepsin từ da cá tra, Pangasianodon hypophthalmu. (Prabjeet Singh, 2010).

Trên phổ IR ta thấy cả hai loại collagen ASC và PSC đều có cấu trúc tương tự nhau và việc thuỷ phân bằng enzyme pepsin không ảnh hưởng đến cấu trúc xoắn ba của collagen. Nhiệt độ biến tính của hai loại khác nhau đôi chút là 39,3^{0}C cho ASC và 39,6^{0}C cho PSC. Việc nghiên cứu thế zeta chỉ ra hai loại ASC và PSC có điện tích trung hoà tương ứng tại pH 4,72 và 5,43. Điều này cho thấy có sự khác nhau với mức độ nhỏ trong thành phần và cấu hình của hai loại nói trên.

Trong công nghiệp, công nghệ được dựa trên những bước căn bản nói trên nhưng có nhiều biến thể tuỳ theo ứng dụng đầu cuối. Ví dụ để sản xuất collagen thuỷ phân dùng trong mĩ phẩm và dược phẩm, người ta còn có công đoạn khử mùi tanh của cá, thịt, tạo hương vanille cho sản phẩm ...

Bảng 8.2 Thành phần acid amin tan trong acid và trong pepsin chiết từ da cá tra. Tính cho 1000 acid amin. Prabjeet Singh (2010)

Acid amin	Collagen hoà tan trong acid	Collagen hoà tan trong pepsin
Alanine	116	114
Arginine	54	54
Aspartic acid/asparagine	46	44
Cysteine	0	0
Glutamic acid/glutamine	80	77
Glycine	309	317
Histidine	4	4
Isoleucine	14	12
Leucine	26	24
Lysine	27	26
Hydroxylysine	5	6
Methionine	10	10
Phenylalanine	13	12
Hydroxylproline	86	91
Proline	120	126
Serine	37	34
Threonine	24	24
Tyrosine	5	3
Tryptophan	0	0
Valine	23	22
Total	1000	1000
Amino acid	206	211

Theo bảng trên, ta thấy hàm lượng glycine nhiều nhất (309-317/1000 gốc). Sau đó là proline (120-126/1000 gốc), alanine (116-114/1000 gốc) và hydroxyproline (86-91/1000 gốc). Như vậy glycine chiếm 1/3 tổng các acid amin và nó xuất hiện theo trình tự glycine-X-Y, tức là cứ ba acid amin trong mạch thì glycine xuất hiện một lần ngoại trừ 14 acid amin đầu tiên tính từ

đầu cuối N và 10 acid amin tính từ đầu C (Foegeding et al., 1996). Hàm lượng acid imin (proline+hydroxyproline) của ASC và PSC tương ứng là 206 và 217/1000 gốc cao hơn hầu hết các loại da cá khác. Hai acid này làm cho collagen ổn định nhiệt tốt hơn do có nhiều các liên kết hydro. Nhiệt độ biến tính của collagen da từ cá basa là khoảng 39^0C khá cao so với cá tuyết (cod) vùng Baltic, chỉ có 14^0C (Elzbieta Zelechowska,2010). Do đó collagen từ da cá basa có nhiệt độ biến tính cao hơn các loại collagen từ da cá khác. Không có cystein và tryptophan trong da cá. Một cách tổng quát, collagen loại một chứa rất ít cysteine (0,02%) và methionine (1,24-1,33%) (Owusu-Apenten, 2002).

Quy trình tách chiết gelatin từ da cá trong phòng thí nghiệm:

Việc tách chiết gelatin từ da cá cũng trên nguyên tắc dùng nhiệt để chuyển collagen thành gelatin trong môi trường acid hoặc kiềm. Quá trình này cắt đứt một số liên kết nội phân tử và liên phân tử, bao gồm một số liên kết amid. Quá trình tách chiết làm ngắn mạch polypeptide và ảnh hưởng đến các tính chất chức năng của gelatin. Sự cắt mạch phụ thuộc vào điều kiện bảo quản da cá, tiền xử lí, các thông số công nghệ (nhiệt độ, thời gian, độ pH). Quá trình tách chiết gồm ba giai đoạn chính: tiền xử lí da cá, tách chiết gelatin, tinh chế và sấy khô. Tuỳ theo phương pháp tiền xử lí ta thu được hai loại gelatin như đã nói trên. Gelatin loại A được sản xuất từ collagen tiền xử lí bằng acid và loại B từ xử lí kiềm. Da cá có cấu tạo từ collagen ít liên kết ngang nên xử lí bằng acid loãng.

Có rất nhiều phương pháp tách chiết gelatin từ da cá và các loài thuỷ sản khác nhau tuỳ theo loài và vùng sinh sống (Gómez-Guillén và cộng sự, 2009). Gómez (Gómez-Guillén và cộng sự, 2001) công bố phương pháp tách chiết gelatin có khả năng tạo gel mạnh như sau: ngâm da cá trong acid loãng để collagen trương nở, sau đó chiết trong nước ở nhiệt độ vừa là 45^0C. Quá trình diễn ra tổng cộng trong 24 giờ.

Kolodziejska (Kolodziejska và cộng sự 2004) cho thấy có thể bỏ qua khâu xử lí hoá học trước khi chiết da cá nước lạnh và giảm thời gian chiết từ 12 giờ xuống còn 30 phút bằng cách cắt nhỏ da cá. Tuy nhiên vì da cá khó cắt nhỏ nên cũng cần phải xử lí acid loãng để dễ cắt.

Tính chất của gelatin cũng bị ảnh hưởng của quá trình bảo quản da. Fernandez (Fernandez-Diaz và cộng sự 2003) ghi nhận rằng da bảo quản ở -12^0C cho gelatin có khả năng tạo gel thấp hơn da bảo quản ở -20^0C. Liu (Liu. H. 2008) cho thấy da cá basa bảo quản khô có gelatin tạo gel chắc hơn da tươi và da bảo quản đông và da khô có hàm lượng các chuỗi xoắn alpha nhiều hơn. Điểm tạo gel và điểm nóng chảy của gelatin từ da khô tương tự da tươi nhưng khác với da bảo quản đông.

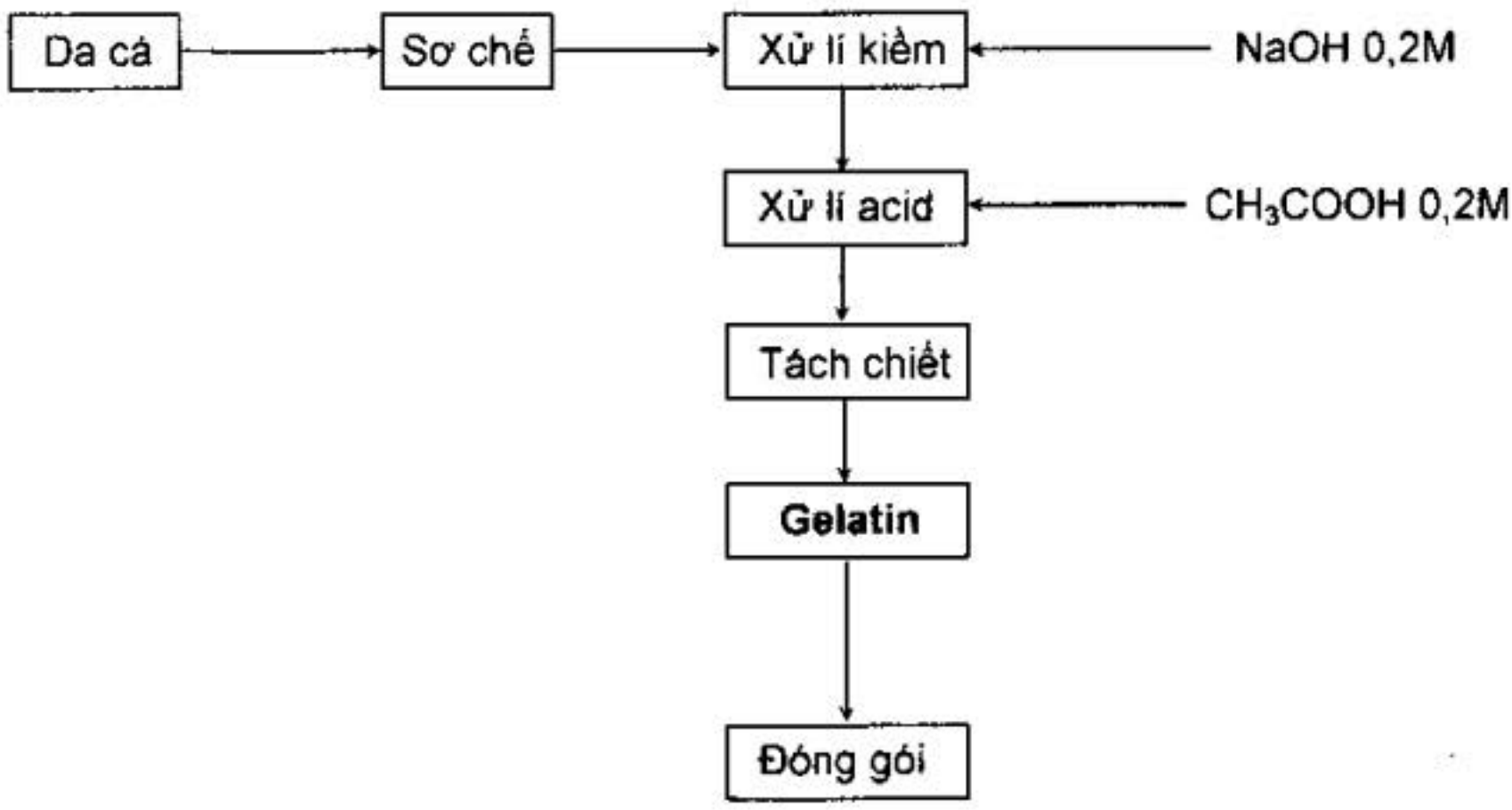
Bảng 8.3 Tính chất và điều kiện tách chiết gelatin từ các loài thuỷ sản khác nhau (Gómez-Guillén và cộng sự, 2009)

Loài	Độ bền gel (g/cm^2)	Nhiệt độ tạo gel (^0C)	Nhiệt độ nóng chảy gel, (^0C)	Điều kiện tiền xử lí
Cá tuyết Atlantic *Gadus morhua*	95			0,3% acid sulfuric / acid citric 0.7%, 45^{0}C.
Cá tuyết Atlantic *G. morhua*	71	10		0,12M acid sulfuric / 0,005M acid citric 56^{0}C, 2 giờ.
Cá hồi Atlantic *Salmo salar*	108	12		0,12M acid sulfuric / 0,005M acid citric, 56^{0}C, 2 giờ.
Alaska Pollack *Theragra chalcogramma*	98 217		21,2 16,1	0,1M hydroxide calcium / 0,05M acid acetic, 50^{0}C, 180 phút.
Mực *Dosidicus gigas* Mực *D. gigas*	10 147	16 12	19 17	0.05M acid acetic. 45^{0}C, qua đêm.
Red tilapia (Cá rô phi đỏ) *Oreochromis nilotica*	128		22,4	Pepsin (1/8000, w/w)+ 0,05 M acid acetic 60^{0}C, qua đêm.
Channel catfish *Ictalurus punctatus*	252			0,2% acid sulfuric / 1% acid citric 45^{0}C, 12 giờ. 0,2M hydroxide sodium / 0,115M acid acetic 55^{0}C, 80 phút

Quy trình tách chiết gelatin (Haiying Liu, 2008 hay Channel catfish Ictalurus punctatus từ Bắc Mĩ):

Sau khi xử lí kiềm để loại bỏ protein không phải collagen, da cá được ngâm trong acid acetic 50 mM với tỉ lệ da/dung dịch là 1:8 ở 15^0C trong 18 giờ. Da cá được rửa bằng nước đến pH =3,5-4. Sau đó da được chiết gelatin bằng nước ở 45^0C trong 7 giờ. Dịch chiết được lọc và cô đặc.

Ngoài ra, quy trình sản xuất khác tại nghiên cứu tại Việt Nam như sau: da cá được cắt thành miếng và ngâm trong nước ấm trong 3-5 giờ. Tiếp theo da được xử lí bằng NaOH 0,2M trong 3 ngày. Sau đó da được rửa sạch và xử lí với acid citric 0,05M cho 3 giờ. Da rửa cẩn thận và chuyển sang chiết xuất gelatin. Các thông số tối ưu để chiết xuất gelatin 0,05M citric acid, nhiệt độ 50^0C cho 3-4 giờ. Trong trường hợp sử dụng nhiệt độ cao hơn 90^0C, thời gian xử lí là 3 giờ. Gelatin có trọng lượng phân tử 95-138 kDa với những tính chất lưu biến tốt. Gelatin chứa 14 acid amin với hàm lượng cao Proline (Võ và cộng sự năm 2008, Huỳnh 2010).



Hình 8.4 Sơ đồ quy trình công nghệ tách chiết gelatin từ da cá

Quy trình sản xuất gelatin công nghiệp:

Trong công nghiệp, quy trình sản xuất gelatin từ các nguyên liệu khác nhau được tiến hành qua các công đoạn chính sau:

Sơ chế nguyên liệu:

Trong công nghiệp, gelatin được tách chiết từ hai loại nguyên liệu chính là xương và da. Xương được cắt nhỏ và xử lí bằng HCl với nồng độ 4-6% ở nhiệt độ 10-20^0C trong một tuần. Trong quá trình này, $Ca_3(PO_4)_2$ và $CaCO_3$

trong xương được làm tan ra trong dung dịch. Quá trình này gọi là làm mềm xương và ta thu được khung cấu trúc protein xương có chứa collagen được gọi là "ossein". Thuật ngữ này có gốc từ tiếng Pháp với "os" nghĩa là xương và "ein" từ chữ protein.

Đối với da bò, người ta loại phần da hoá sừng bên ngoài dùng cho ngành thuộc da, lớp trong tiếp xúc với thịt thường chứa mỡ cũng được loại ra, chỉ lấy phần giữa có chứa nhiều collagen. Đối với da heo, người ta loại lớp mỡ phía trong, giữ lại lớp da phía ngoài để chế biến gelatin. Da cá rất mỏng do quá trình tách da bằng máy nên không cần xử lí cơ học gì thêm, chỉ cắt nhỏ trước khi xử lí.

Xử lí nguyên liệu

Collagen trong mô liên kết của động vật hoà tan rất chậm ngay cả trong nước sôi do có các liên kết ngang giữa các phân tử collagen. Do đó cần xử lí hoá học để thuỷ phân các liên kết ngang trước khi tách chiết. Việc xử lí này cần ở điều kiện nhẹ nhàng để tránh ảnh hưởng đến chất lượng gelatin. Thường dùng acid hoặc kiềm thật loãng để xử lí, sao cho chỉ có các liên kết ngang bị cắt đứt. Đối với da động vật già, thường dùng xử lí kiềm mạnh hơn, còn đối với da động vật còn non chỉ cần acid loãng và thời gian ngắn để xử lí. Ngoài acid và kiềm, người ta còn kết hợp với xử lí bằng enzyme collagenase. Khi đó gelatin có thể được cơ thể người tiêu hoá.

Khi xử lí bằng kiềm, người ta có thể dùng dung dịch NaOH 1% trong vài ngày ở nhiệt độ thường. Gelatin thu được theo cách xử lí kiềm gọi là gelatin B. Khi xử lí bằng acid, thường dùng H_2SO_4 hay HCl nồng độ 2-4% trong một ngày và sản phẩm sau đó gọi là gelatin A.

Tách chiết

Theo công nghệ truyền thống người ta nấu chiết gián đoạn nguyên liệu trong nước theo nhiều giai đoạn với nhiệt độ tăng từ 50- 100^0C. Mỗi giai đoạn kéo dài vài giờ, mỗi lần chiết được khoảng 3-7% gelatin. Công nghệ hiện đại sản xuất theo phương pháp liên tục ở pH từ 2-3 theo nguyên lí ngược dòng. Theo công nghệ này, quá trình chiết nhanh hơn, sản phẩm đều hơn, có độ Bloom cao, độ nhớt thấp và có màu nhẹ hơn. Các thông số tách chiết cần được tối ưu hoá theo từng công nghệ khác nhau.

Công đoạn lọc

Sau khi nấu chiết, dung dịch gelatin cần được phân li trong các máy phân li ba pha để loại các cặn rắn và mỡ ra khỏi dịch chiết và đi vào thiết bị lọc. Thường dùng thiết bị lọc với chất trợ lọc là diatomit hoặc perlite. Do các

quá trình xử lí và trung hoà, trong dịch chiết còn chứa nhiều muối do đó cần có quá trình loại muối bằng trao đổi ion. Trong công nghệ hiện đại, người ta dùng phương pháp siêu lọc để vừa loại muối, vừa làm tăng nồng độ gelatin.

Cô đặc

Sau khi tinh chế và loại muối, hàm lượng nước trong dịch gelatin là trên 95%. Để bảo quản, cần có gelatin với hàm lượng ẩm từ 10-12%. Có thể cô đặc bằng phương pháp chân không nhiều tầng. Nồng độ gelatin sau khi cô đặc đạt khoảng 50%. Sau đó dịch được thanh trùng.

Sấy và nghiền

Sau khi thanh trùng, dịch gelatin được làm lạnh để tạo gel và đưa vào máy ép để tạo sợi và đưa vào máy sấy. Trong công nghiệp, việc sấy khô gelatin là một việc khá khó khăn và đòi hỏi thiết bị được chế tạo đặc biệt. Thách thức kĩ thuật là khi sấy khô ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ nóng chảy, trường hợp gelatin từ bò khoảng 35^0C, thì gelatin sẽ chảy ra và làm cho việc sấy trở nên khó khăn. Do đó sau khi cô đặc, gelatin được làm lạnh đến 5^0C và cho vào máy ép đùn để tạo ra các sợi gel. Các sợi này được cho vào một máy sấy chuyên dụng bằng không khí nóng. Điểm đặc biệt của máy này là băng chuyền đi qua các buồng có nhiệt độ tăng dần, sao cho nước tách ra mà không làm nóng chảy gelatin. Đây là một kĩ thuật sấy đòi hỏi trình độ cao. Không khí sấy ban đầu có nhiệt độ 30^0C, độ ẩm 10-15% sau đó nâng nhiệt độ lên dần tuỳ theo độ ẩm của gelatin. Nhiệt độ cuối của không khí khoảng 60^0C và độ ẩm của sản phẩm khoảng 10%. Sau đó các sợi gelatin khô được nghiền và đóng gói.

Công nghệ sản xuất gelatin hoà tan:

Một sản phẩm hiện đại của gelatin đang có ứng dụng rộng rãi là gelatine thuỷ phân (Gelatine hydrolysate) hay có tên thương mại là collagen thuỷ phân. Đó là gelatin có khối lượng phân tử nhỏ, từ 500-25 000g/mol, có thể tan trong nước lạnh và không tạo gel. Theo Luật thực phẩm châu Âu, chúng được gọi là gelatin ăn được không tạo gel.

Công nghệ này có các bước căn bản giống như quy trình sản xuất gelatine ăn được nhưng phân tử collagen được cắt ngắn bằng quá trình thuỷ phân nhiều giai đoạn bằng enzyme kết hợp với hoá học, vật lí cho đến khi thu được các đoạn mạch có khối lượng phân tử mong muốn. Mặc dù gelatin có thể được thuỷ phân bằng các loại enzyme khác nhau như pepsin, neutrase, alkalase, bromelain hay papain, chỉ có các loại enzyme đặc hiệu collagenase được sử dụng để sản xuất gelatin thuỷ phân. Việc chọn enzyme và điều kiện thuỷ phân quyết định đến tính chất cảm quan của sản phẩm cuối cùng. Sau khi tinh chế và cô đặc, dịch được sấy phun.

5. Ứng dụng

Collagen ngày nay trở thành một vật liệu sinh học có nhiều ứng dụng trong y học do nó có tính phân huỷ sinh học và tính kháng nguyên yếu. Nó được dùng làm chất nhả chậm thuốc, dùng trong kĩ thuật mô. Nó còn được dùng trong điều trị bệnh thấp khớp và xơ cứng khớp.

Trong nhãn khoa collagen có rất nhiều ứng dụng như cấy ghép giác mạc, chỉ khâu tự tiêu, kính áp tròng, dung dịch thuỷ tinh dùng trong quá trình mổ mắt. Collagen dùng làm chất nhả chậm thuốc ở bề mặt giác mạc.

Một trong các ứng dụng thương mại mạnh nhất của collagen trong y học là làm thuốc tiêm dạng nước để sửa chữa các hư hỏng của da. Các loại thuốc này đã phát triển rất mạnh trong những năm qua. Các loại thuốc tiêm tương tự cũng đã sử dụng thành công để điều trị một số bệnh khác như bất động dây thanh quản (vocal fold immobility) và bệnh tiểu không kiểm soát (urinary incontinence).

Một trong những nghiên cứu đầu tiên về việc nhả chậm thuốc của collagen được tiến hành hiệu quả với thuốc gây mê và thuốc giảm đau. Kết quả cho thấy khi tiêm thuốc trong dung dịch có collagen kéo dài thời gian của thuốc lên gấp 3-5 lần. Việc nhả chậm thuốc cũng được tiến hành đối với các loại thuốc có bản chất là protein. Đã có nhiều nghiên cứu về tương tác của protein thuốc với mạng lưới collagen từ đó tạo nền tảng cho sự nhả chậm thuốc vào cơ thể.

Collagen dạng xốp (sponge) được dùng là băng vết thương và cầm máu. Để tạo dạng này, người ta đông khô collagen đã trương nở trong acid hoặc kiềm. Độ xốp của nó có thể thay đổi bằng cách thay đổi nồng độ collagen và tốc độ làm đông. Collagen xốp là vật liệu vô cùng quan trọng trong điều trị bỏng nặng và dùng làm băng cho rất nhiều loại vết thương. Một ưu điểm lớn của collagen trong việc điều trị vết thương là nó có thể hấp thu một lượng lớn dịch rỉ ra từ vết thương, dính nhẹ nhàng lên khu vực vết thương và vẫn giữ được độ ẩm cũng như ngăn cản được sự thâm nhập của các vi sinh vật nhiễm vào vết thương. Bên cạnh các tính chất vật lí, collagen còn thúc đẩy quá trình phát triển các tế bào để tạo các mô mới tại vết thương. Kết hợp với thuốc kháng sinh, các loại băng từ bọt xốp collagen có thể nhả chậm thuốc kháng sinh trong quá trình điều trị.

Gelatin được dùng vì nó không có vị lạ với các tính chất duy nhất như tạo nhũ tương, liên kết, ổn định và tạo gel. Điều này làm cho gelatin là phụ gia thực phẩm lí tưởng đối với nhiều loại thực phẩm. Gelatin dùng làm chất ổn định bọt, một yêu cầu chính của các sản phẩm kem, đồ tráng miệng.

Với tính chất mềm dẻo, an toàn, gelatin tiếp tục giữ vị trí là chất tạo vỏ thuốc. Gelatin từ xương bò được dùng phổ biến để tạo gelatin mềm trong công nghiệp dược phẩm.

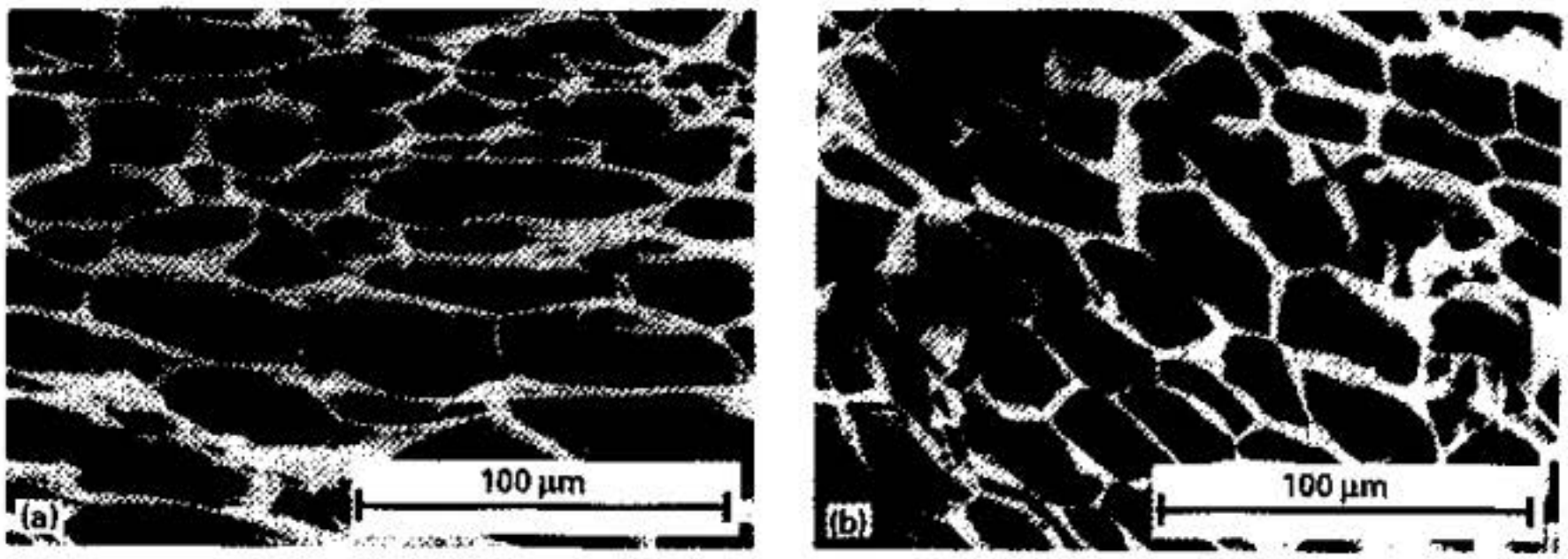
Gelatin còn được dùng trong công nghiệp phim ảnh. Nó được dùng trong giấy in ảnh và phim nhựa.

Gelatin thuỷ phân được dùng trong mĩ phẩm và thực phẩm. Cùng với acid hyaluronic và chondroitin, gelatin thuỷ phân có mặt trong rất nhiều sản phẩm thuộc thực phẩm chức năng và nước uống bổ dưỡng cho da, xương và khớp. Đây là một ngành kinh doanh đang bùng nổ trên thị trường thế giới.

Ứng dụng của gelatin trong công nghệ sinh học, kĩ thuật mô:

Hiện nay, nhu cầu thay thế các mô và nội tạng ngày càng nhiều và vượt quá khả năng hiến tặng, do đó đòi hỏi phải có nguồn thay thế được nuôi cấy trên các tế bào chuyên biệt hoặc trên các polymer tự nhiên hay tổng hợp. Các polymer đó đóng vai trò là các giá đỡ trong kĩ thuật nuôi cấy mô và là chất mang của các nhân tố phát triển (growth factors) để giải phóng chậm các nhân tố đó. Các polymer đó phải bảo đảm hai yêu cầu. Thứ nhất là các polymer đó phải có độ xốp cao để có bề mặt riêng lớn, tạo điều kiện cho các tế bào bám vào đó và phát triển trước khi cấy ghép. Polymer đó không được ức chế quá trình khuếch tán của các tế bào vào các mô xung quanh trong quá trình cấy ghép và thêm vào đó nó cần có tác dụng thúc đẩy quá trình tạo mạch máu trong mô phát triển. Thứ hai là các polymer làm giá đỡ phải có khả năng tự phân huỷ sinh học và loại ra khỏi cơ thể. Trong các polymer sinh học được sử dụng trong kĩ thuật nuôi cấy mô, gelatin được sử dụng rộng rãi vì nó đáp ứng được hai yêu cầu trên.

Để tạo gelatin làm giá đỡ, phương pháp mới hiện nay làm đông khô với chất tạo xốp là nước. Người ta tiến hành theo ba công đoạn. Đầu tiên là tạo liên kết ngang giữa gelatin và glutaraldehyde. Sau đó gel được cho ngậm nước hoàn toàn với hàm lượng nước là 98%. Bước hai gel gelatin được đưa đi làm đông -80^0C hoặc nitơ lỏng rồi đưa đi tách nước bằng phương pháp đông khô. Sản phẩm là khối gelatin khô có độ xốp cao. Nhiệt độ tạo làm đông càng thấp, kích thước lỗ xốp càng nhỏ và mật độ càng cao. Đó là do khi làm đông ở nhiệt độ càng thấp, kích thước tinh thể đá càng nhỏ và do đó sau khi thăng hoa để lại các lỗ xốp có kích thước nhỏ. Như vậy bằng các thay đổi nhiệt độ làm đông, có thể điều khiển được quá trình tạo gel với kích thước lỗ xốp khác nhau.



Hình 8.5 Ảnh hiển vi điện tử SEM của mặt cắt ngang khối gel gelatin sau khi làm khô. a) Làm đông ở -80^{0}C b) làm đông trong nitơ lỏng (Hye-Won Kang, Yasuhico Tabata, & Ikada, 1999)

Gelatin từ lâu đã được dùng làm vỏ bọc thuốc (capsule) nhưng hiện nay để nâng cao hiệu quả nạp và giải phóng thuốc, người ta chế tạo các hạt gelatin ở kích thước nano, cỡ 200-300 nm. Đó là do gelatin có tính kháng nguyên thấp, tương thích sinh học tốt, không độc, dễ biến đổi hoá học và tạo liên kết ngang. Trong liệu pháp miễn dịch, hạt nanogelatin được dùng để gắn các oligonucleotide CpG vào các hạch bạch huyết để gây nên tính miễn dịch chống khối u hiệu quả hơn. Để tăng cường khả năng tương thích sinh học và giảm tính kháng nguyên, hiện nay người ta đang nghiên cứu tạo ra gelatin người trên cơ sở tái tổ hợp gen. Trong những năm qua, các hạt nanogelatin đã được áp dụng thành công trong việc đưa thuốc có nguồn gốc protein đến các cơ quan đích trong cơ thể. Liên quan đến kĩ thuật này có hai vấn đề: một là nạp thuốc thành công lên bề mặt các hạt nanogelatin và hai là giải phóng thuốc có điều khiển trong cơ quan đích.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

Huỳnh Nguyễn Duy Bảo, 2010. Tài liệu cá nhân.

Trần Thị Luyến, 2004. *Báo cáo tổng kết dự án sản xuất thử nghiệm cấp bộ sản xuất chitin-chitosan từ phế liệu thuỷ sản*. Trường Đại học Thuỷ sản, Nha Trang.

Trần Thị Luyến, Nguyễn Trọng Bách, 2005. *Nghiên cứu khả năng làm giảm số lượng vi sinh vật trên bề mặt thịt bò*. Tạp chí Khoa học Công nghệ thuỷ sản, Trường Đại học Thuỷ sản Nha Trang, số 3.

Trần Thị Luyến, Nguyễn Thị Hiên, 2006. *Nghiên cứu sử dụng oligoglucozamin từ chitosan vỏ tôm, vỏ ghẹ để thay thế $NaNO_3$ trong bảo quản xúc xích gà surimi*. Tạp chí Khoa học Công nghệ thuỷ sản, Trường Đại học Thuỷ sản Nha Trang, số 1, 3-8.

Ngô Đăng Nghĩa, 1999. *Tối ưu hoá quy trình công nghệ sản xuất alginat natri từ rong mơ Việt Nam và ứng dụng nó trong một số lĩnh vực sản xuất*. Luận án tiến sĩ kĩ thuật, Trường Đại học Thuỷ sản, Nha Trang, 1999.

Ngô Đăng Nghĩa, 1996. *Khảo sát thành phần và sự phân bố của các gốc uronat trong phân tử alginat tách chiết từ một số loài rong mơ Việt Nam bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân*. Tập san khoa học và công nghệ thuỷ sản, số đặc biệt kỉ niệm 37 năm thành lập Trường Đại học Thuỷ sản Nha Trang, 27-33.

Ngô Đăng Nghĩa, 1997. *Sự tương quan giữa tính chất tạo gel và thành phần các gốc uronat trong phân tử alginat tách chiết từ một số loài rong mơ Việt Nam*. Tạp chí Thuỷ sản, số 1, 12-14.

Ngô Đăng Nghĩa, Nguyễn Trọng Cẩn, 1997. *Nghiên cứu các nhân tố ảnh hưởng đến chất lượng alginat trong công đoạn nấu chiết*. Tạp chí Thuỷ sản, số 5, 5-7.

Ngô Đăng Nghĩa, 1998. *Nghiên cứu động học phản ứng quá trình lên men ethanol bằng tế bào Saccharomyces cerevisae cố định trên gel alginat*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Tập XXXVI, số 2, 19-24.

Ngô Đăng Nghĩa, Đỗ Minh Phụng, Trang Sĩ Trung, 1997. *Nghiên cứu độ nhớt của alginat tách chiết từ rong mơ Việt Nam*. Tập san Khoa học và Công nghệ Thuỷ sản, Trường Đại học Thuỷ sản, số 2, 9-15.

Khổng Trung Thắng, 2010. Tài liệu cá nhân

Trang Sĩ Trung, 2005. *Nghiên cứu ứng dụng chitosan làm chậm quá trình phân rã của thức ăn tôm trong môi trường ao nuôi- TR2004-33-11*. Báo cáo tổng kết đề tài.

Trang Sĩ Trung, Phạm Thị Đan Phương, 2005. *Nghiên cứu ứng dụng chitosan trong việc làm giảm độ phân rã thức ăn tôm*. Tạp chí Khoa học Công nghệ Thuỷ sản, 4, 18-22.

Trang Sĩ Trung, Vũ Ngọc Bội, Phạm Thị Đan Phượng, 2007. *Nghiên cứu kết hợp enzyme protease trong công nghệ sản xuất chitin từ phế liệu đầu vỏ tôm*. Tạp chí Khoa học Công nghệ Thuỷ sản, 3, 11-17.

Trang Sĩ Trung, Nguyễn Thị Phương, Phạm Thị Minh Hải, Phạm Thị Đan Phượng, 2008. *Nghiên cứu ứng dụng chitosan trong việc thu hồi protein từ nước rửa Surimi*. Tạp chí Khoa học Công nghệ Thuỷ sản, 2, 25-30.

Trang Sĩ Trung, Ngô Thị Hoài Dương, Phạm Thị Đan Phượng, 2008. *Kết hợp xử lí sơ bộ bằng acid formic trong quy trình chế biến phế liệu tôm để nâng cao chất lượng chitin-chitosan*. Tạp chí Khoa học Công nghệ Thuỷ sản, 4, 11-16.

Trang Sĩ Trung, 2009. *Đánh giá chất lượng sản phẩm và hiệu quả môi trường của quy trình sản xuất chitin cải tiến kết hợp xử lí enzyme*. Tạp chí Khoa học Công nghệ Thuỷ sản, 1, 3-9.

Tiếng Anh

A-S. Michel, M.M.Mestdagh, M.A.V. Axelos, 1997. *Physico-chemical properties of carrageenan in presence of various cations*. Int. J. Biol. Macromolecules, 21, 195-200.

Boral Shilpi and H.B. Bohidar, 2010. *Effect of Ionic Strength on Surface-Selective Patch Binding-Induced Phase Separation and Coacervation in Similarli Charged Gelatin-Agar Molecular System*. J.Phys. Chem. B 114, 12027-12035.

Boral Shilpi and H.B. Bohidar, 2012. *Effect of Water Structure on Gelation of Agar in Glycerol Solutions and Phase Diagram of Agar Organogels*. J. Phys.Chem.B, 116, 7113-7121.

Boral Shilpi, Anita Saxena, and H.B. Bohidar, 2008. *Universal Growth of Microdomains and Gelation Transition in Agar Hydrogels*. J. Phys. Chem. B. 112, 3625-3632.

Boral Shilpi, Anita Saxena, and H.B. Bohidar, 2010. *Syneresis in agar hydrogels*. Int. J. Biol. Macromolecules 46, 232-236.

C.Rochas, M.Rinaudo, S. Landry, 1989. *Relation between the molecular structure and mechanical properties of carrageenan gels*. Carbohydrate Polymers 10, 115-127.

Corinne Rondeau-Mouro, Agata Zykwinska, Sylvie Durand, Jean-Louis Doublier, Alain Buleon, 2004. *NMR investigations of the 4-ethyl guaicol self-diffusion in ionta(i)-carrageenan*. Carbohydrate Polymers 57, 459-468.

Fraztl Peter, 2008. *Collagen, Structure and Mechanics*. Springer, Germany.

Grasdalen Hans, Bjorn Larsen and Olav Smidsrod, 1978. *Uronic acid sequence in alginates by ^{13}C nuclear magnetic resonance*. Dissertation, University of Trondheim, Norway.

Grasdalen Hans , Bjorn Larsen, and Olav Smidsrod, 1981. *^{13}C NMR Studies of Monomerric Composition and Sequence in Alginate*. Carbohydrate Research, 89, 179-191.

Grasdalen Hans , Bjorn Larsen, and Olav Smidsrod, 1997. *^{13}C NMR Studies of Alginate*. Carbohydrate Research, 56, 11-15.

Grasdalen Hans, 1983. *High-field, ^{1}H- N.M.R Spectroscopy of Alginate : Sequential structure and linkage conformations*. Carbohydrate Research, 118, 225-260.

Grasdalen Hans, Bjorn Larsen, and Olav Smidsrod 1979. *A P.M.R Study of the Composition and Sequence of Uronate Residues in Alginate*. Carbohydrate Research, 68, 23-31.

H.D. Graham, 1977. *Food colloids*. Westport, Connecticut, AVI Publishing Co., Inc.

Harris J.Bixler, Hans Porse, 2010. *A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry*. J. Appl. Phycol. Published on line 22 May 2010.

Hirano, S., 1996. *Chitin biotechnology application*. Biotechnology Annual Review, 2, 237-258.

Kamalesh Prasad,A.K. Siddhanta, M. Ganesan, B.K. Ramavat, B.Jha, Pushpito K. Ghosh, 2007. *Agars of Gelidielle acerosa of west and southeast coasts of India*. Bioresource Technology 98, 1907-1915.

Kim, S.K, Mendis, E., 2006. *Bioactive compounds from marine processing byproducts- A review*. Food Res. Int., 39, 383-393.

Kurt I. Draget, Catherine Taylor 2009. *Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications*. Food Hydrocolloids xxx, 1–6.

Lahaye, M., 2001. *Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry*. J.Appl.Phycol. 13, 173-184

Lee, D.W., Lim, H., Chong, H.N., Shim, W.S., 2009. *Advances in chitosan material and its hybrid derivatives: A review*. The Open Biomaterials J., 1, 10-20.

M.T. Nickersona, A.T. Paulsona, F.R. Hallettb, 2004. *Dilute solution properties of k-carrageenan polysaccharides: effectof potassium and calcium ions on chain conformation*. Carbohydrate Polymers 58 25–33.

Majeti N.V. Ravi Kumar, 2000. *A review of chitin and chitosan applications*. Reactive & Functional Polymers 46 1–27.

Marcel Dekker, Marguerite Rinaudo, 2006. *Chitin and chitosan: Properties and applications*. Prog. Polim. Sci. 31 603–632.

Mc.Hugh,D.J., 2003. *A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper*. No 441, Rome, FAO.

Owusu-Apenten, R. K. 2002. *Food protein analisis*. New York: Marcel Dekker, Inc.

Prabjeet Singh, Soottawat Benjakul, Sajid Maqsood, Hideki Kishimura, 2010. *Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (Pangasianodon hypophthalmus)*. Food Chemistry xxx, xxx–xxx.

R.L. Davidson, 1980. *Handbook of water-soluble gums*, edited by, New York, McGraw-Hill Book Co.

Ronald J. Gillespie, David A. Humphreys, N. Colin Baird, Edward A. Robinson 1986. *Chemistry*. Allin and Bacon, Inc, Newyork.

Ruth Falshaw, Richard H. Furneaux, David E. Stevenson, 1998. *Agars from nine species of red seaweed in the genus Curdiea (Gracilariaceae, Rhodophyta)*. Carbohydrate Research 308 107-115.

Setthakaset, P., Pichyangkura, R., Ajavakom, A. and Sukwattanasinitt, M., 2008. *Preparation of N-acetyl-D-Glucosamine Using Enzyme from Aspergillus sp.* Journal of Metals, Materials and Minerals 2, 53-57.

Shiamalee Perumal, Olga Antipova, and Joseph P. R. O. Orgel, 2008. *Collagen fibril architecture, domain organization, and triple-helical conformation govern its proteolisis.* PNAS, February 26, 105

Singh D.K., Ray, A.R., 2000. *Biomedical applications of chitin, chitosan and their derivatives*. J.M.S-REV. Macromol. Chem. Phys., C 40 69-83.

Smidsrod O., Draget, K.I., 1996. *Alginates: chemistry and physical properties*, Carbohydr.Eur. 14, 6-13.

Smidsrod O., Storker T.Moe, 2008. *Biopolymer Chemistry*. Tapir academic press, Trondheim, Norway.

Trang Si Trung, 2011. *Shrimp by-product and new method for chitin production in Vietnam, Proceedings of 9th Asia Pacific Chitin Chitosan Symposium*. Nha Trang, Vietnam.

Vivek Kumar , Ravi Fotedar, 2009. *Agar extraction process for Gracilaria cliftonii (Withell, Millar, & Kraft, 1994)*. Carbohydr. Polim. 78, 813–819.

Vo, Q.V., Pham, V.H., Ha, T.T., 2008. *Study on gelatin processing from "Tra" (Pangasius hypophthalmus) catfish skin. Proceedings of the 1st International conference on Food Science and Technology-Mekong River Delta-Vietnam*. Agriculture Publishing House.

Wolfgang Friess, 1998. *Collagen – biomaterial for drug delivery1. Review article*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 45, 113–136.

Y. Freile-Pelegrin , E. Murano, 2005. *Agars from three species of Gracilaria (Rhodophyta) from Yucatan Peninsula*. Biores.Technol. 96, 295 302.

Zhang, Z.H., Sun, Y.S., Pang, H., Munyendo, W.L.L., Li, H.X, Zhu, S.L., 2011. *Preparation and evaluation of Berberine alginate beads for stomach-specific delivery*. Molecules, 16, 10347-10356.

Gómez-Guillén, M. C., Sarabia, A. I., Solas, M. T., & Montero, P. . (2001). *Effect of microbial transglutaminase on the functional properties of megrim (Lepido-rhombus boscii) skin gelatin*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81, 665-673.

Gómez-Guillén M.C. M. Pérez-Mateos, J. Gómez-Estaca, E. López-Caballero, B. Giménez and P. Monteroet (2009). *Fish gelatin:a renewable material for developing active biodegradable films*. Trends in Food Science & Technology 20, 3-16.

Hye-Won Kang, Yasuhico Tabata, & Ikada, Yoshito. (1999). *Fabrication of porous gelatin scaffold for tissue engineering*. Biomaterials, 20.

Kenneth Ofokansi, Gerhard Wnter, Gert fricker, & Coester, Conrad. (2010). *Matrix-loaded biodegradable gelatin nanoparticles as new approach to improve drug loading and delivery*. Eur. J. Pharm. Biopharm, 76, 1-9.

Kolodziejska, I., Kaczorowski, K., Piotrowska, B., & Sadowska, M. (2004). *Modifica-tion of the properties of gelatin from skins of Baltic cod (Gadus morhua) with transglutaminase*. Food Chemistry, 86, 203-209.

Fernandez-Diaz, M. D., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2001). *Gel properties of collagens from skins of cod (Gadua morhua) and hake (Merluccius merluccius) and their modification by the coenhancers magnesium sulphate, glycerol and transglutaminase*. Food Chemistry, 74, 161–167.

Liu, H., Li, D., & Guo, S. (2008). *Rheological properties of channel catfish (Ictalurus punctaus) gelatine from fish skins preserved by different methods*. LWT – Food Science and Technology, 41, 414-419.

MỤC LỤC

	Trang
Lời nói đầu	3
PHẦN 1: CÁC KIẾN THỨC CĂN BẢN VỀ POLYMER SINH HỌC	
Chương 1: Cấu trúc hoá học của các polymer sinh học	5
1. Các đại phân tử polymer và polymer sinh học	5
2. Protein	6
3. Đường và các polysaccharide	13
Chương 2: Cấu trúc, tính chất của các polymer sinh học	19
1. Cấu hình của các polymer sinh học	19
2. Tính chất vật lí của các polymer sinh học	23
Chương 3: Các phương pháp nghiên cứu polymer sinh học	47
1. Phương pháp đo độ nhớt	47
2. Phổ hồng ngoại	48
3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân	49
4. Sắc kí	53
5. Điện di	57
PHẦN 2: CÁC POLYMER SINH HỌC BIỂN CÓ NGUỒN GỐC THỰC VẬT	
Chương 4: Agar	63
1. Sơ lược lịch sử, thuật ngữ	63
2. Cấu trúc hoá học	65
3. Tính chất	67
4. Tách chiết	70
5. Ứng dụng	73
Chương 5: Alginat	75
1. Sơ lược lịch sử, thuật ngữ	75
2. Cấu trúc hoá học	77
3. Tính chất	82
4. Tách chiết	88
5. Ứng dụng	93
Chương 6: Carrageenan	98
1. Sơ lược lịch sử, thuật ngữ	98
2. Cấu trúc hoá học	99

3. Tính chất 101
4. Tách chiết 104
5. Ứng dụng 107

PHẦN 3: CÁC POLYMER SINH HỌC BIẾN CÓ NGUỒN GỐC ĐỘNG VẬT

Chương 7: Chitin – Chitosan 109
1. Sơ lược lịch sử, thuật ngữ 109
2. Tính chất 112
3. Tách chiết 118
4. Ứng dụng 132

Chương 8: Collagen – Gelatin 136
1. Sơ lược lịch sử, thuật ngữ 136
2. Cấu trúc hoá học 136
3. Tính chất 140
4. Tách chiết 142
5. Ứng dụng 149

TÀI LIỆU THAM KHẢO 151

Chịu trách nhiệm xuất bản:
Chủ tịch Hội đồng thành viên kiêm Tổng Giám đốc NGÔ TRẦN ÁI
Tổng biên tập kiêm Phó Tổng Giám đốc NGUYỄN QUÝ THAO

Tổ chức bản thảo và chịu trách nhiệm nội dung:
Phó Tổng biên tập PHAN XUÂN KHÁNH
Phó Giám đốc phụ trách Công ty CP Dịch vụ xuất bản giáo dục Gia Định
TRẦN THỊ KIM NHUNG

Biên tập nội dung:
ĐẶNG CÔNG HIỆP
NGÔ THỊ LINH PHƯƠNG

Trình bày bìa:
PHẠM NGỌC NGA

Sửa bản in:
Ban biên tập Khoa học tự nhiên

Chế bản:
Công ty CP DVXB giáo dục Gia Định

Công ty cổ phần Dịch vụ xuất bản giáo dục Gia Định -
Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam giữ quyền công bố tác phẩm.

POLYMER SINH HỌC BIỂN

Mã số : 7K744M2-DVN
Số đăng kí KHXB : 1484-2012/CXB/1-1862/GD
Tại **CÔNG TY CỔ PHẦN IN KHUYẾN HỌC PHÍA NAM,** Tp.HCM
In 120 cuốn (QĐ in số: 44), khổ 17 x 24 cm
In xong và nộp lưu chiểu tháng 12 năm 2012.